

U.F.R. DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE ROUEN

Année 2012

N°

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

ALFONSI Maud

Née le 16 Juin 1983 à Créteil (94)

Présentée et soutenue publiquement le 25 Octobre 2012

**Transition SAMS/SAMR chez les patients
atteints de mucoviscidose suivis au CHU de
Rouen : dynamique de colonisation et lien
avec les cures antibiotiques**

Président du jury : Madame Martine PESTEL-CARON Professeur des Universités (PU-PH), Rouen

Directeur de thèse : Monsieur Ludovic LEMEE Docteur en Pharmacie (PH), Rouen

Membres du jury : Monsieur Christophe MARGUET Professeur des Universités (PU-PH), Rouen

Monsieur Stéphane DOMINIQUE Docteur en Médecine (PH), Rouen

ANNEE UNIVERSITAIRE 2011 ~ 2012
U.F.R. DE MEDECINE~PHARMACIE DE ROUEN

DOYEN :	Professeur Pierre FREGER
ASSESSEURS :	Professeur Michel GUERBET Professeur Benoit VEBER Professeur Pascal JOLY Professeur Bernard PROUST
DOYENS HONORAIRES :	Professeurs J. BORDE - Ph. LAURET - H. FIGUET – C. THUILLEZ
PROFESSEURS HONORAIRES :	MM. M-P AUGUSTIN - J.ANDRIEU-GUTTRANCOURT - M.BENOZIO - J.BORDE - Ph. BRASSEUR - R. COLIN - E. COMOY - J. DALION -. DESHAYES - C. FESSARD – J.P FILLASTRE - P.FRIGOT -J. GARNIER - J. HEMET - B. HILLEMAND - G. HUMBERT - J.M. JOUANY - R. LAUMONIER – Ph. LAURET - M. LE FUR – J.P. LEMERCIER - J.P LEMOINE - Mle MAGARD - MM. B. MAITROT - M. MAISONNET - F. MATRAY - P.MITROFANOFF - Mme A. M. ORECCHIONI - P. PASQUIS - H.FIGUET - M.SAMSON – Mme SAMSON-DOLLFUS – J.C. SCHRUB - R.SOYER - B.TARDIF -.TESTART - J.M. THOMINE – C. THUILLEZ - P.TRON - C.WINCKLER - L.M.WOLF

I - MEDECINE

PROFESSEURS

M. Frédéric ANSELME	HCN	Cardiologie
M. Bruno BACHY	HCN	Chirurgie pédiatrique
M. Fabrice BAUER	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya BEKRI	HCN	Biochimie et Biologie Moléculaire
M. Jacques BENICHO	HCN	Biostatistiques et informatique médicale
M. Eric BERCOFF	HB	Médecine interne (gériatrie)
M. Jean-Paul BESSOU	HCN	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
Mme Françoise BEURET-BLANQUART	CRMPR	Médecine physique et de réadaptation
M. Guy BONMARCHAND	HCN	Réanimation médicale
M. Olivier BOYER	UFR	Immunologie
M. Jean-François CAILLARD	HCN	Médecine et santé au Travail
M. François CARON	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
M. Philippe CHASSAGNE	HB	Médecine interne (Gériatrie)
M. Alain CRIBIER (<i>Surnombre</i>)	HCN	Cardiologie
M. Antoine CUVELIER	HB	Pneumologie

M. Pierre CZERNICHOW	HCH	Epidémiologie, économie de la santé
M. Jean - Nicolas DACHER	HCN	Radiologie et Imagerie Médicale
M. Stéfan DARMONI	HCN	Informatique Médicale/Techniques de communication
M. Pierre DECHELOTTE	HCN	Nutrition
Mme Danièle DEHESDIN	HCN	Oto-Rhino-Laryngologie
M. Philippe DENIS (Surnombre)	HCN	Physiologie
M. Jean DOUCET	HB	Thérapeutique/Médecine – Interne - Gériatrie.
M. Bernard DUBRAY	CB	Radiothérapie
M. Philippe DUCROTTE	HCN	Hépat – Gastro - Entérologie
M. Frank DUJARDIN	HCN	Chirurgie Orthopédique - Traumatologique
M. Fabrice DUPARC	HCN	Anatomie - Chirurgie Orthopédique et Traumatologique
M. Bertrand DUREUIL	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mle Hélène ELTCHANINOFF	HCN	Cardiologie
M. Thierry FREBOURG	UFR	Génétique
M. Pierre FREGER	HCN	Anatomie/Neurochirurgie
M. Jean François GEHANNO	HCN	Médecine et Santé au Travail
M. Emmanuel GERARDIN	HCN	Imagerie Médicale
Mme Priscille GERARDIN	HCN	Pédopsychiatrie
M. Michel GODIN	HB	Néphrologie
M. Philippe GRISE	HCN	Urologie
M. Didier HANNEQUIN	HCN	Neurologie
M. Fabrice JARDIN	CB	Hématologie
M. Luc-Marie JOLY	HCN	Médecine d'urgence
M. Pascal JOLY	HCN	Dermato - vénéréologie
M. Jean-Marc KUHN	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mme Annie LAQUERRIERE	HCN	Anatomie cytologie pathologiques
M. Vincent LAUDENBACH	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
M. Alain LAVOINNE	UFR	Biochimie et biologie moléculaire
M. Joël LECHEVALLIER	HCN	Chirurgie infantile
M. Hervé LEFEBVRE	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
M. Xavier LE LOET	HB	Rhumatologie
M. Eric LEREBOURS	HCN	Nutrition
Mle Anne-Marie LEROI	HCN	Physiologie
M. Hervé LEVESQUE	HB	Médecine interne
Mme Agnès LIARD-ZMUDA	HCN	Chirurgie Infantile

M. Bertrand MACE	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. Eric MALLET (<i>Surnombre</i>)	HCN	Pédiatrie
M. Christophe MARGUET	HCN	Pédiatrie
Mlle Isabelle MARIE	HB	Médecine Interne
M. Jean-Paul MARIE	HCN	ORL
M. Loïc MARPEAU	HCN	Gynécologie - obstétrique
M. Stéphane MARRET	HCN	Pédiatrie
M. Pierre MICHEL	HCN	Hépat - Gastro - Entérologie
M. Francis MICHOT	HCN	Chirurgie digestive
M. Bruno MIHOUT	HCN	Neurologie
M. Pierre-Yves MILLIEZ	HCN	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique
M. Jean-François MUIR	HB	Pneumologie
M. Marc MURAINÉ	HCN	Ophthalmologie
M. Philippe MUSETTE	HCN	Dermatologie - Vénérologie
M. Christophe PEILLON	HCN	Chirurgie générale
M. Jean-Marc PERON	HCN	Stomatologie et chirurgie maxillo-faciale
M. Christian PFISTER	HCN	Urologie
M. Jean-Christophe PLANTIER	HCN	Bactériologie - Virologie
M. Didier PLISSONNIER	HCN	Chirurgie vasculaire
M. Bernard PROUST	HCN	Médecine légale
M. François PROUST	HCN	Neurochirurgie
Mme Nathalie RIVES	HCN	Biologie et méd. du dévelop. et de la reprod.
M. Jean-Christophe RICHARD (<i>Mise en dispo</i>)	HCN	Réanimation Médicale, Médecine d'urgence
M. Horace ROMAN	HCN	Gynécologie Obstétrique
M. Jean-Christophe SABOURIN	HCN	Anatomie – Pathologie
M. Guillaume SAVOYE	HCN	Hépat - Gastro
M. Michel SCOTTE	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne TAMION	HCN	Thérapeutique
Mlle Florence THIBAUT	HCN	Psychiatrie d'adultes
M. Luc THIBERVILLE	HCN	Pneumologie
M. Christian THUILLEZ	HB	Pharmacologie
M. Hervé TILLY	CB	Hématologie et transfusion
M. François TRON (<i>Surnombre</i>)	UFR	Immunologie
M. Jean-Jacques TUECH	HCN	Chirurgie digestive
M. Jean-Pierre VANNIER	HCN	Pédiatrie génétique

M. Benoît VEBER	HCN	Anesthésiologie Réanimation chirurgicale
M. Pierre VERA	C.B	Biophysique et traitement de l'image
M. Eric VERSPYCK	HCN	Gynécologie obstétrique
M. Olivier VITTECOQ	HB	Rhumatologie
M. Jacques WEBER	HCN	Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES

Mme Noëlle BARBIER-FREBOURG	HCN	Bactériologie – Virologie
M. Jeremy BELLIEN	HCN	Pharmacologie
Mme Carole BRASSE LAGNEL	HCN	Biochimie
Mme Mireille CASTANET	HCN	Pédiatrie
M. Gérard BUCHONNET	HCN	Hématologie
Mme Nathalie CHASTAN	HCN	Physiologie
Mme Sophie CLAEYSSSENS	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
M. Moïse COEFFIER	HCN	Nutrition
M. Vincent COMPERE	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
M. Manuel ETIENNE	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
M. Guillaume GOURCEROL	HCN	Physiologie
Mme Catherine HAAS-HUBSCHER	HCN	Anesthésie - Réanimation chirurgicale
M. Serge JACQUOT	UFR	Immunologie
M. Joël LADNER	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
M. Jean-Baptiste LATOUCHE	UFR	Biologie Cellulaire
Mme Lucie MARECHAL-GUYANT	HCN	Neurologie
M. Jean-François MENARD	HCN	Biophysique
Mme Muriel QUILLARD	HCN	Biochimie et Biologie moléculaire
M. Vincent RICHARD	UFR	Pharmacologie
M. Francis ROUSSEL	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
Mme Pascale SAUGIER-VEBER	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire TOBENAS-DUJARDIN	HCN	Anatomie
M. Eric VERIN	HCN	Physiologie

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS

M. Thierry LEQUERRE	HB	Rhumatologie
M. Fabien DOGUET	HCN	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire

PROFESSEUR AGREGÉ OU CERTIFIÉMme Dominique **LANIEZ**

UFR

Anglais

Mme Michèle **GUIGOT**

UFR

Sciences humaines - Techniques d'expression

II - PHARMACIE

PROFESSEURS

M. Thierry BESSON	Chimie Thérapeutique
M. Jean-Jacques BONNET	Pharmacologie
M. Roland CAPRON (PU-PH)	Biophysique
M. Jean COSTENTIN (PU-PH)	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
M. Loïc FAVENNEC (PU-PH)	Parasitologie
M. Michel GUERBET	Toxicologie
M. Olivier LAFONT	Chimie organique
Mme Isabelle LEROUX	Physiologie
Mme Elisabeth SEGUIN	Pharmacognosie
M. Marc VASSE (PU-PH)	Hématologie
M Jean-Marie VAUGEOIS (Délégation CNRS)	Pharmacologie
M. Philippe VERITE	Chimie analytique

MAITRES DE CONFERENCES

Mle Cécile BARBOT	Chimie Générale et Minérale
Mme Dominique BOUCHER	Pharmacologie
M. Frédéric BOUNOURE	Pharmacie Galénique
Mme Martine PESTEL-CARON	Microbiologie
M. Abdeslam CHAGRAOUI	Physiologie
M. Jean CHASTANG	Biomathématiques
Mme Marie Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Elizabeth CHOSSON	Botanique
Mle Cécile CORBIERE	Biochimie
M. Eric DITTMAR	Biophysique
Mme Nathalie DOURMAP	Pharmacologie
Mle Isabelle DUBUC	Pharmacologie
Mme Roseline DUCLOS	Pharmacie Galénique
M. Abdelhakim ELOMRI	Pharmacognosie
M. François ESTOUR	Chimie Organique

M. Gilles GARGALA (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Najla GHARBI	Chimie analytique
Mle Marie-Laure GROULT	Botanique
M. Hervé HUE	Biophysique et Mathématiques
Mme Hong LU	Biologie
Mme Sabine MENAGER	Chimie organique
Mme Christelle MONTEIL	Toxicologie
M. Paul MULDER	Sciences du médicament
M. Mohamed SKIBA	Pharmacie Galénique
Mme Malika SKIBA	Pharmacie Galénique
Mme Christine THARASSE	Chimie thérapeutique
M. Rémi VARIN (MCU-PH)	Pharmacie Hospitalière
M. Frédéric ZIEGLER	Biochimie

PROFESSEUR ASSOCIE

M. Jean-Pierre GOULLE	Toxicologie
------------------------------	-------------

MAITRE DE CONFERENCE ASSOCIE

Mme Sandrine PANCHOU	Pharmacie Officinale
-----------------------------	----------------------

PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

Mme Anne-Marie ANZELLOTTI	Anglais
----------------------------------	---------

ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

M. Bérénice COQUEREL	Chimie Analytique
M. Johann PELTIER	Microbiologie

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS : Mme Véronique DELAFONTAINE

HCN - Hôpital Charles Nicolle

HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME

CB - Centre HENRI BECQUEREL

CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray

CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation

III – MEDECINE GENERALE

PROFESSEURS

M. Jean-Loup HERMIL	UFR	Médecine générale
----------------------------	-----	-------------------

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS :

M. Pierre FAINSILBER	UFR	Médecine générale
-----------------------------	-----	-------------------

M. Alain MERCIER	UFR	Médecine générale
-------------------------	-----	-------------------

M. Philippe NGUYEN THANH	UFR	Médecine générale
---------------------------------	-----	-------------------

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS :

M Emmanuel LEFEBVRE	UFR	Médecine générale
----------------------------	-----	-------------------

Mme Elisabeth MAUVIARD	UFR	Médecine générale
-------------------------------	-----	-------------------

Mme Marie Thérèse THUEUX	UFR	Médecine générale
---------------------------------	-----	-------------------

LISTE DES RESPONSABLES DE DISCIPLINE

Melle Cécile BARBOT	Chimie Générale et Minérale
M. Thierry BESSON	Chimie thérapeutique
M. Roland CAPRON	Biophysique
M Jean CHASTANG	Mathématiques
Mme Marie-Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation, Economie de la Santé
Mle Elisabeth CHOSSON	Botanique
M. Jean COSTENTIN	Pharmacodynamie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
M. Loïc FAVENNEC	Parasitologie
M. Michel GUERBET	Toxicologie
M. Olivier LAFONT	Chimie organique
M. Jean-Louis PONS	Microbiologie
Mme Elisabeth SEGUIN	Pharmacognosie
M. Mohamed SKIBA	Pharmacie Galénique
M. Marc VASSE	Hématologie
M. Philippe VERITE	Chimie analytique

ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS**MAITRES DE CONFERENCES**

M. Sahil **ADRIOUCH**

Biochimie et biologie moléculaire
(Unité Inserm 905)

Mme Gaëlle **BOUGEARD-DENOYELLE**

Biochimie et biologie moléculaire
(Unité Inserm 614)

M. Antoine **OUVRARD-PASCAUD**

Physiologie (Unité Inserm 644)

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

M. Mario **TOSI**

Biochimie et biologie moléculaire
(Unité Inserm 614)

M. Serguei **FETISSOV**

Physiologie (Groupe ADEN)

Mme Su **RUAN**

Par délibération en date du 03 Mars 1967, la faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

Introduction générale.....4

I. La Mucoviscidose5

A. Historique.....	5
B. Epidémiologie	5
C. Physiopathologie et aspects génétiques.....	7
1. Le gène de la mucoviscidose	7
2. La protéine CFTR : structure, fonction	8
3. Conséquences des mutations du gène de la mucoviscidose	9
D. Dépistage.....	12
E. Manifestations cliniques	14
1. Manifestations respiratoires.....	14
2. Manifestations digestives	19
3. Manifestations génitales	20
4. Manifestations autres	20
F. Prise en charge thérapeutique	21
1. Prise en charge respiratoire.....	21
2. Prise en charge digestive	24
3. Recherche thérapeutique.....	24
G. Evolution et pronostic	24

II. Les infections respiratoires dans la mucoviscidose.....25

A. Infections bactériennes.....	26
1. <i>Haemophilus influenzae</i>	28
2. <i>Staphylococcus aureus</i>	28
3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36
4. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	37
5. <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	38
6. Complexe <i>Burkholderia cepacia</i>	38
7. Mycobactéries non tuberculeuses	39
B. Infections fongiques	39
C. Infections virales	39

III. Méthodes d'identification et de typage

***Staphylococcus aureus* 40**

A. Identification phénotypique de <i>S. aureus</i>	40
B. Méthodes de typage de <i>S. aureus</i>	43
1. PFGE	43
2. MLST	43
3. <i>Spa</i> typing	44
4. MLVA	45
5. Cassette SCCmec pour MRSA	45
6. Epidémiologie de <i>S. aureus</i> en France	46

Objectifs de l'étude 49

IV. Patients, matériels et méthodes 50

A. Sélection des patients	50
B. Sélection des <i>S. aureus</i>	50
C. Isolement et culture des <i>S. aureus</i>	51
D. Séquençage du gène <i>spa</i>	51
1. Extraction	51
2. PCR	51
3. Purification des produits de PCR	52
4. Réaction de séquence	52
5. Purification des produits de séquence	53
6. Séquençage	54
7. Analyse des séquences	54
E. Recueil des antibiothérapies	54

V. Résultats 55

A. Descriptif des patients	55
B. Descriptif des <i>S. aureus</i> étudiés	55
C. Profils de sensibilités aux antibiotiques des isolats étudiés	57
D. Génotypage des isolats (« <i>spa</i> -typing »)	58
E. Antibiothérapies reçues autour de « l'événement SAMR »	67
1. Antibiothérapies prescrites avant « l'événement SAMR »	67
2. Cures antibiotiques visant « l'événement SAMR »	68

VI. Discussion	72
VII. Conclusion et perspectives	80
VIII. Annexe	82
IX. Bibliographie	83
Liste des principales abréviations	96

Introduction générale

La mucoviscidose est une pathologie complexe, dont le retentissement s'étend à de nombreux organes. L'atteinte respiratoire est la plus préoccupante, car elle met en jeu le pronostic vital des patients. Les infections bronchopulmonaires en sont la principale cause, et son l'apanage des bactéries principalement, mais également d'autres germes, tels que les champignons et les virus. Parmi les bactéries fréquemment retrouvées dans les sécrétions bronchopulmonaires de ces patients, certaines ont une pathogénicité prouvée, tel que *Pseudomonas aeruginosa*, tandis que d'autres n'ont pas pu être clairement établies comme responsable de la symptomatologie respiratoire et de son déclin. C'est notamment le cas de *Staphylococcus aureus*, pourtant une des bactéries isolée de façon majoritaire dans les prélèvements bronchopulmonaires des patients atteints de mucoviscidose. La compréhension de la physiopathologie de l'atteinte respiratoire liée à la présence de *S. aureus*, requiert d'entreprendre de nouvelles études, afin de mieux appréhender les mesures thérapeutiques nécessaires.

L'épidémiologie des staphylocoques dorés chez les patients atteints de mucoviscidose est un des volets de cette meilleure compréhension, mais est pourtant mal connue. En outre, en parallèle à son augmentation mondiale, la prévalence accrue des *S. aureus* résistant à la méticilline (SAMR) n'échappe pas à la mucoviscidose. La présence de SAMR chez ces patients n'est pas sans conséquences en terme de choix thérapeutiques et de mesures préventives quant à sa transmission, et invite à mieux connaître la dynamique de sa colonisation chez ces patients.

Ce mémoire est consacré à l'analyse de la colonisation à *S. aureus* chez les patients atteints de mucoviscidose suivis au Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose (CRCM) de Rouen. Cette étude cherche à établir la cartographie de l'épidémiologie staphylococcique de ces patients, et de l'inscrire dans l'environnement antibiotique qui entoure la prise en charge respiratoire. Ceci afin de commencer à appréhender la dynamique évolutive de la colonisation à *S. aureus* au CRCM de Rouen. Une première étape de ce travail concerne la description moléculaire de *S. aureus*, qu'il s'agisse de *S. aureus* sensible à la méticilline (SAMS) ou de SAMR, grâce au séquençage du gène *spa*. Les circonstances de survenue de l'acquisition de SAMR, et leur prise en charge antibiotique feront enfin l'objet du dernier volet de ce mémoire.

Partie I

I. La Mucoviscidose

A. Historique

Déjà connue au Moyen-âge comme la maladie du "baiser salé" (*"Malheur à l'enfant qui laisse un goût de sel quand on l'embrasse, on lui a jeté un sort et il mourra bientôt"*), la mucoviscidose sera décrite pour la première fois en 1936 par le médecin suisse Guido Fanconi von Grebe, sous le nom de fibrose kystique. Puis, dès 1935, la pédopathologiste de New York, Dorothy Andersen, avec le concours de M. Blanc, un pathologiste genevois, à partir de 27 observations, réussit à réellement individualiser la maladie fibrokystique du pancréas et développe, avec le concours de Sydney Farber, un pédopathologiste de Boston, le concept d'une maladie héréditaire touchant électivement les sécrétions muqueuses. En 1948 eut lieu la première observation française de cette pathologie, à l'hôpital des Enfants Malades. Il s'agissait d'un enfant de 5 ans, adressé au Dr M. Lamy, et dont un des internes de l'époque, C. Nézélof, rapporte les étapes d'un diagnostic difficile de cette maladie peu connue (Christian, 2009). Le gène codant pour la protéine CFTR fut ensuite localisé sur le bras long du chromosome 7 (7q31) en 1985, puis cloné par la démarche de « clonage positionnel » en 1989 (Riordan et al., 1989). Près de 1900 (<http://www.genet.sickkids.on.ca/Home.html>) mutations différentes ont été décrites à ce jour sur ce gène très instable à l'origine de la physiopathologie de la mucoviscidose.

B. Epidémiologie

L'incidence de la mucoviscidose est variable selon les populations : rare dans les populations asiatiques (1/30 000) ou africaines (1/15 000), elle est la plus fréquente des maladies génétiques potentiellement graves dès l'enfance dans les populations caucasiennes d'Europe et d'Amérique du Nord, avec des disparités au sein de chaque pays.

En France, le taux de prévalence au niveau national est estimé à 10 pour 100 000 personnes en novembre 2011 (Orphanet, 2012), avec des disparités entre départements (**Figure 1**), la majorité des malades étant concentrée sur une zone Nord-Ouest (Bretagne, Normandie, Nord) d'une part, et sur une zone Est d'autre part (Alsace, Rhône-Alpes, Provence-Alpes-Côte-d'Azur). Le taux de prévalence à la naissance, ou incidence, est estimé à 1/4366 naissances au niveau national sur la période 2002-2006.

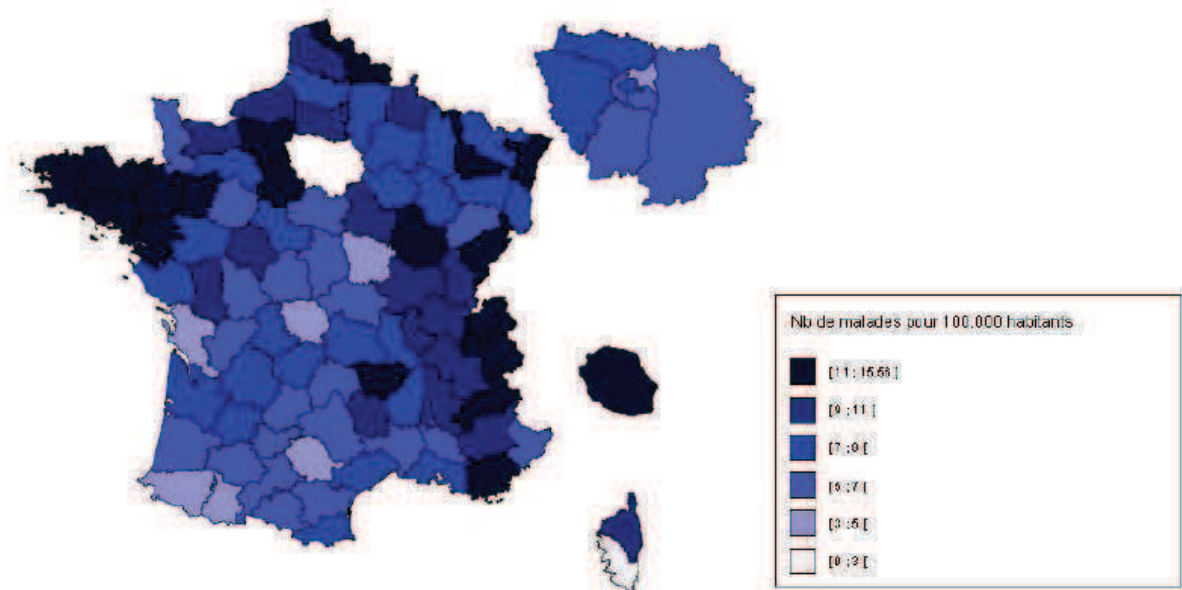


Figure 1 Prévalence de la Mucoviscidose par département (nombre de patient pour 100 000 habitants (Vaincre la Mucoviscidose and Ined, 2010b).

Les données du Registre Français de la Mucoviscidose (Vaincre la Mucoviscidose and Ined, 2010b), recueillies grâce au concours de 64 Centres de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose (CRCM), ont permis de recenser 5792 patients au cours de l'année 2010 (Vaincre la Mucoviscidose and Ined, 2010b). Les avancées en terme de dépistage néonatal et de prise en charge adaptée au sein des CRCM ont permis d'atteindre une espérance de vie de 46 ans, parallèle avec une augmentation de la proportion d'adultes (**Figure 2**).

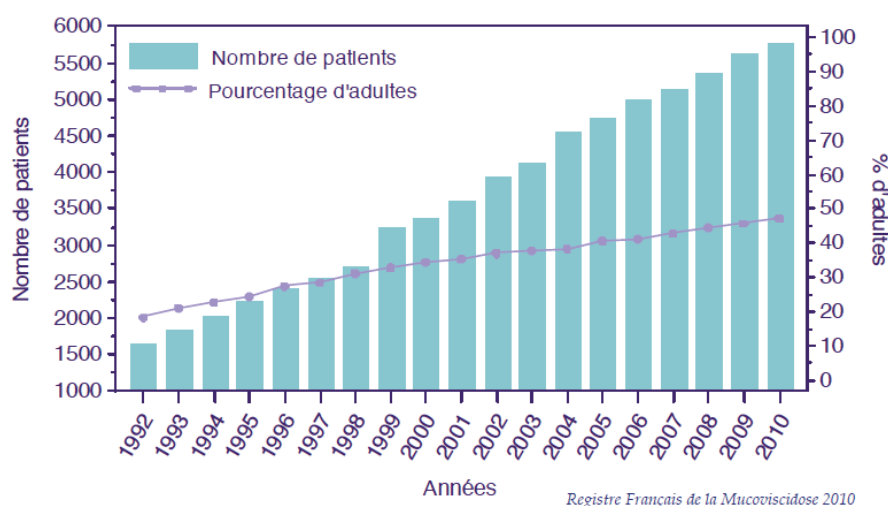


Figure 2 Nombre de patients vus dans les CRCM dans l'année 2010 et pourcentage d'adulte ; évolution depuis 1992 (Vaincre la Mucoviscidose and Ined, 2010b).

Les caractéristiques de la population de patients suivis dans les CRCM et leur évolution de 2001 à 2010 sont détaillées dans le **Tableau 1**.

Tableau 1 Caractéristiques de la population des patients suivis dans les CRCM (Vaincre la Mucoviscidose and Ined, 2010b).

Indicateurs	Années d'enquête									
	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Patients recensés*	3601	3941	4117	4549	4755	5003	5148	5379	5650	5792
Patients vus dans l'année**	3589	3936	4111	4544	4745	4994	5140	5357	5628	5758
Enfants	2317	2476	2550	2799	2812	2932	2935	2971	3049	3040
Adultes	1272	1460	1561	1745	1933	2062	2205	2386	2579	2718
+ de 40 ans	90	119	124	160	175	196	226	272	329	358
Hommes	1875	2054	2157	2368	2497	2595	2686	2786	2916	2958
Femmes	1714	1882	1954	2176	2248	2399	2454	2571	2712	2800
Age moyen (années)	15.2	15.6	15.8	16	16.3	16.4	16.8	17.3	17.7	18.1
Age médian (années)	14	14	14	14	15	15	15	16	16	16
Age minimum (années)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Age maximum (années)	72	71	77	78	74	76	77	78	79	80

Registre Français de la Mucoviscidose 2010

Cependant, les avancées en termes d'espérance de vie s'accompagnent inévitablement de complications multiples liées à la maladie elle-même, mais aussi à la prise en charge thérapeutique des patients, qui comprend des traitements lourds et contraignants. Les travaux de recherche ont ainsi un grand rôle qui leur incombe, dans la compréhension de la physiopathologie fondamentale de cette maladie, ainsi que, de façon liée, dans le progrès des thérapeutiques et du contrôle de leurs effets indésirables.

C. Physiopathologie et aspects génétiques

La mucoviscidose est une maladie génétique autosomique récessive, dont l'origine est la présence de mutations au sein du gène codant pour la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), et nécessitant ainsi l'héritage de deux mutations, l'une provenant du père, l'autre de la mère, pour pouvoir s'exprimer. On estime qu'environ 1 personne sur 25 à 30 est porteuse d'un allèle muté.

1. Le gène de la mucoviscidose

Ce gène de 230 kilobases (kb) impliqué dans cette pathologie est situé sur le bras long du chromosome 7 (7q31). Il est transcrit en un ARN messager de 6,5 kb composé de 27 exons qui codent la chaîne des 1480 acides aminés constituant la protéine CFTR. L'identification de ce gène a été facilitée par la découverte initiale, chez près de 70% des malades, d'une délétion de trois nucléotides entraînant l'absence d'un acide aminé phénylalanine, normalement situé en position 508 sur la protéine CFTR (mutation $\Delta F508$).

2. La protéine CFTR : structure, fonction

La protéine CFTR est de nature transmembranaire, ATP dépendante. Un modèle de structure a été proposé, sur la base de l'analyse des séquences nucléotidiques codantes du gène (Riordan et al., 1989).

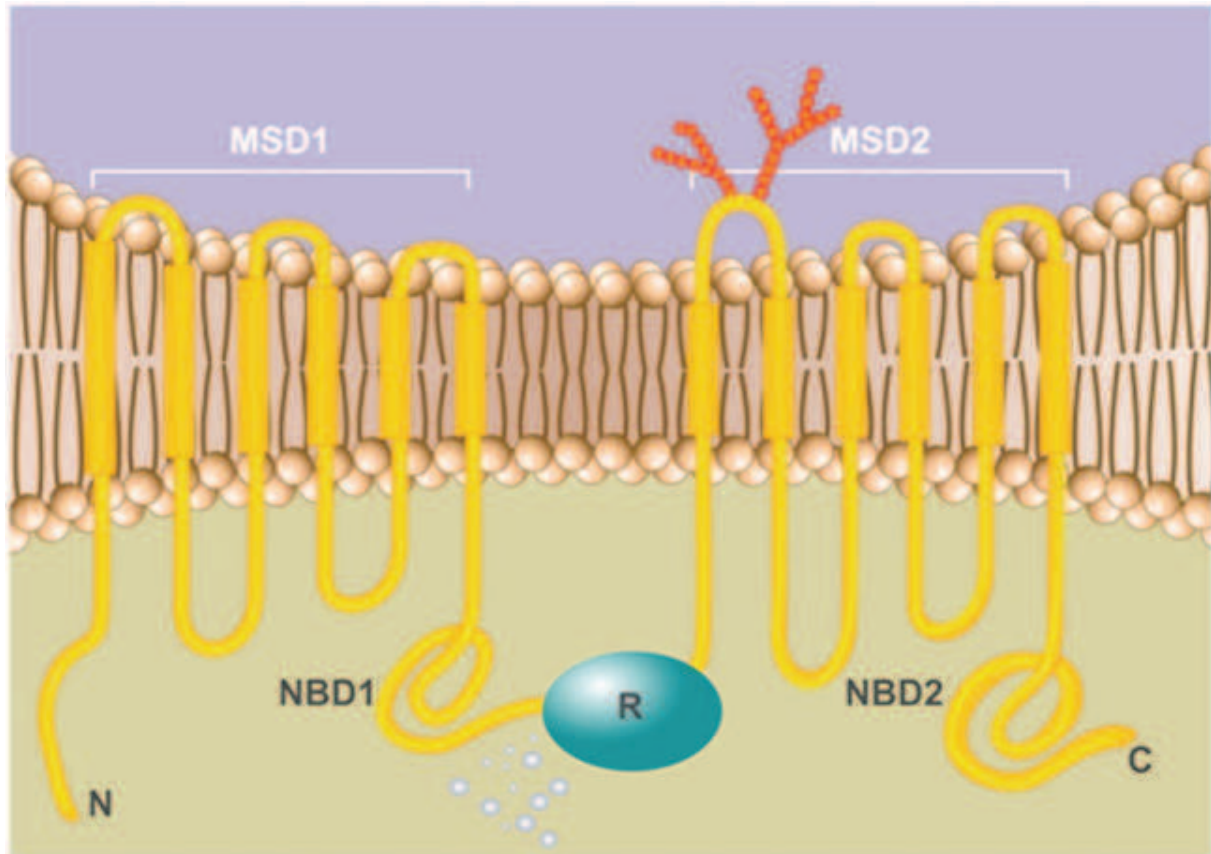


Figure 3 Structure prédictive de la protéine CFTR. Elle comporte deux domaines transmembranaires (MSD1 et MSD2), deux domaines capables de fixer l'ATP et un domaine régulateur central (R) (Lubamba et al., 2012).

La protéine s'insère dans la membrane cytoplasmique grâce à deux groupes de six hélices α hydrophobes (MSD1 et MSD2) (**Figure 3**). Elle comporte également deux domaines hydrophiles NBD1 et NBD2 (Nucleotid Binding Domain) capables de fixer l'ATP, ainsi qu'un domaine régulateur R qui expose à sa surface plusieurs serines phosphorylables par les protéines kinases A et C. Cette protéine fait ainsi partie du groupe des protéines ABC (ATP-binding cassette), grâce à des similitudes de séquences des domaines NBF notamment, impliquées dans le transport de molécules à travers les membranes cellulaires.

Ses fonctionnalités sont multiples, mais encore partiellement élucidées. La plus importante est le rôle de régulation des échanges hydroélectriques à travers les membranes épithéliales (**Figure 4**). La protéine CFTR est en effet un canal chlore qui est capable d'agir sur d'autres canaux ioniques, notamment chlore, potassium et sodium (ENaC, épithélial Na channel). CFTR est capable d'inhiber les canaux ENaC présents sur les épithéliums, et ainsi de limiter l'entrée de sodium dans les cellules,

tandis qu'elle active les canaux ORCC (Outwarly Rectifying Chloride Channel) qui laissent sortir l'ion chlore cellulaire. L'eau suivant les mouvements de chlore et de sel, CFTR est ainsi un acteur majeur de l'état d'hydratation des muqueuses, notamment celles de l'épithélium bronchique (Durieu and Josserand, 2008).

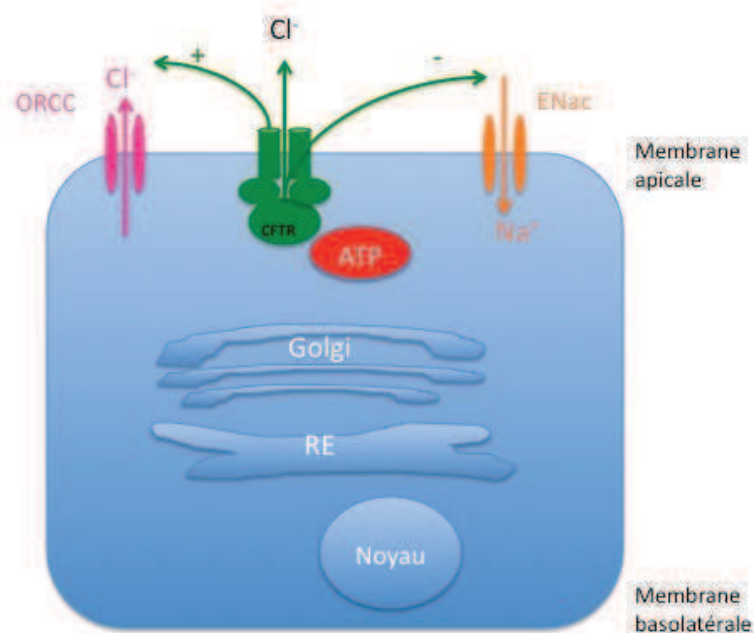


Figure 4 Régulation des flux ioniques par la protéine CFTR.

Son rôle de régulateur s'étendrait à de nombreux autres domaines, tels que celui de l'endo- et de l'exocytose, de la sécrétion de glycoprotéines et de mucines, du contrôle du pH de certains organelles intracellulaires, du transport de l'ATP et du glutathion, de la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires (Mehta, 2005).

Par sa localisation au niveau apical des cellules épithéliales, la protéine CFTR exerce ses différentes fonctions de façon étendue dans l'organisme. Elle se situe principalement au sein des épithéliums des canaux pancréatiques, des glandes salivaires et bronchiques, notamment dans les cellules ciliées des voies aériennes proximales et distales, bronchiolaires et alvéolaires, ainsi qu'au niveau des canaux déférents de l'épididyme.

Les mutations au sein du gène *cfr* ont donc une large portée dans l'organisme, expliquant ainsi la symptomatologie variée de la mucoviscidose.

3. Conséquences des mutations du gène de la mucoviscidose

Actuellement, plus de 1900 mutations ont été identifiées. Il s'agit, pour la plus grande majorité, de mutations ponctuelles : faux-sens, décalage du cadre de lecture, non-sens, délétions,

mutations affectant l'épissage, etc. Elles ont été classées en six catégories en fonction du mécanisme par lequel elles peuvent être responsables d'une perte de fonctionnalité de la protéine CFTR, de façon totale ou partielle (**Figure 5**).

La classe I correspond aux mutations responsables d'absence de production de la protéine ; les mutations de la classe II, dont la mutation $\Delta F508$ fait partie, sont à l'origine d'un défaut de maturation de la protéine, avec une dégradation prématurée de la protéine dans le cytoplasme ; les classes III et IV regroupent les mutations entraînant une protéine non fonctionnelle, soit par un défaut de régulation par l'ATP (classe III), soit par une mauvaise conductance ionique (classe IV). Ce sont essentiellement des mutations faux-sens localisées dans les exons qui codent pour les domaines de liaison à l'ATP en ce qui concerne la classe III, ou pour les domaines transmembranaires en ce qui concerne la classe IV. Enfin, les mutations de classe V engendrent une quantité réduite de protéine fonctionnelle. Il s'agit dans la majorité des cas de mutations affectant l'épissage du gène CFTR (Durieu and Josserand, 2008; Ravilly Sophie, 2007).

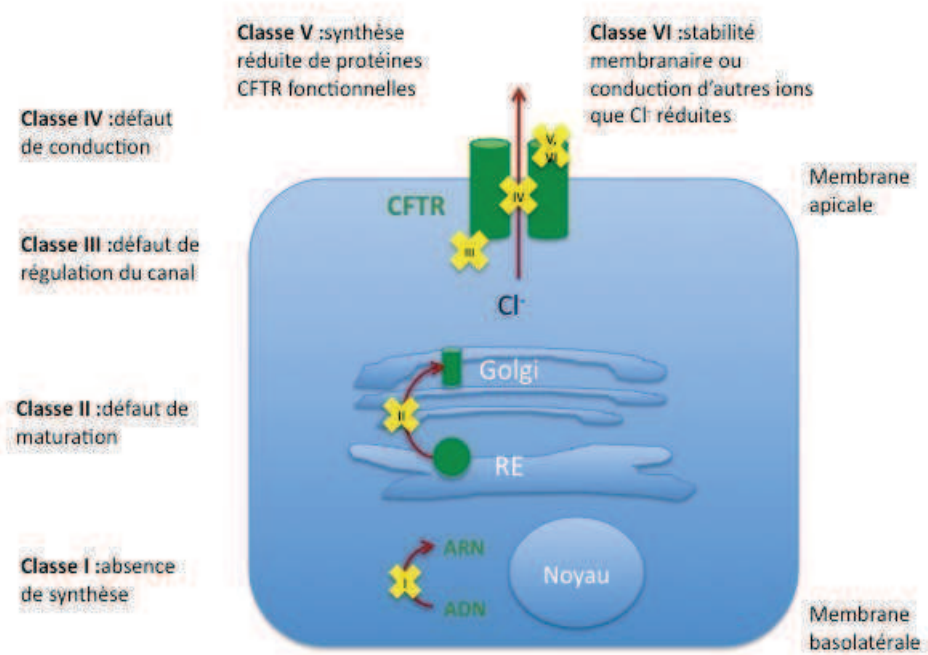


Figure 5 Classification des mutations du gène CFTR.

Cette classification ne prend cependant pas en compte la symptomatologie réelle de la maladie. En effet, la relation génotype-phénotype ne peut être établie de façon fiable à partir de ces différents types de mutations, de part la grande variabilité clinique de cette pathologie. Les différentes classes de mutations ont néanmoins été regroupées selon la sévérité des phénotypes les plus fréquemment retrouvés (**Tableau 2**).

Tableau 2 Classification des mutations du gène CFTR (Lubamba et al., 2012).

Class	Mutation prototypes	Consequences
<i>Severe CF phenotype</i>		
I	G542X, W1282X, R553X, 3950delT	CFTR is not synthesized because of stop codons or splicing defects
II	F508del, N1303K	CFTR is synthesized but in an immature form (only partly glycosylated, misfolded, not released from the endoplasmic reticulum) and is mostly degraded by the ubiquitin-proteasomal pathway
III	G551D	CFTR is synthesized and transported to the plasma membrane, but its activation and regulation by ATP or cAMP are disrupted
<i>Milder CF phenotype</i>		
IV	R334W, G314E, R347P, D1152H	CFTR is synthesized and expressed at the plasma membrane, but chloride conductance is reduced
V	3849 + 10 kb C > T, 3272-26 A > G	CFTR synthesis or processing is partly defective
<i>Severe CF phenotype</i>		
VI	1811 + 1.6 kb A > G	CFTR is synthesized, but membrane stability or conductance of ions other than chloride is reduced

Bien que la majorité des patients soit désormais diagnostiqués dès leurs premiers mois de vie, il reste cependant un nombre non négligeable de patients, développant une symptomatologie incomplète, qui sont diagnostiqués plus tardivement, traduisant la grande hétérogénéité de l'expression de cette pathologie. Il semble néanmoins que la gravité de l'atteinte dépende du niveau d'activité de la protéine CFTR, du point de vue quantitatif et qualitatif : plus le niveau d'activité de la protéine CFTR est faible, plus le type d'expression de la maladie est sévère (**Figure 6**). Des études ont été ainsi entreprises afin de tenter d'établir une relation entre génotype et phénotype.

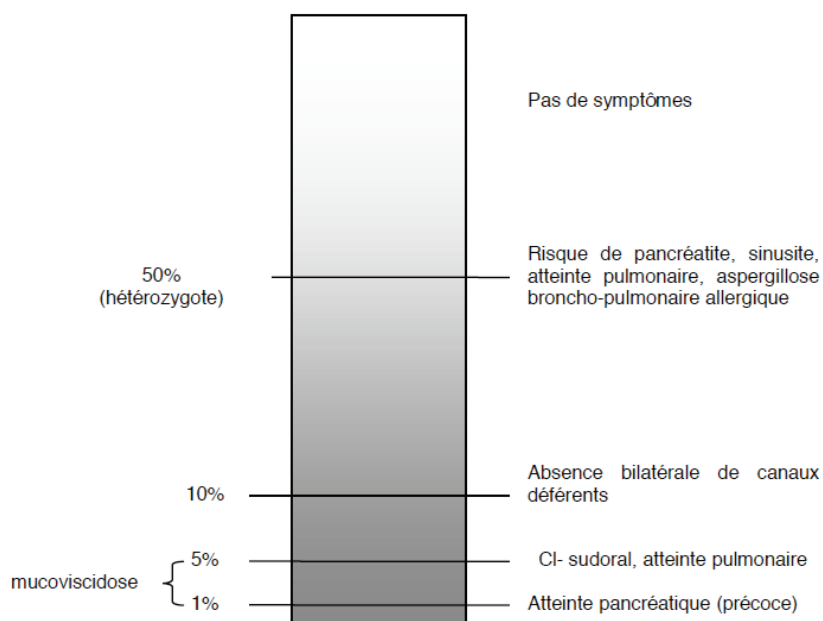


Figure 6 Manifestations cliniques liées à l'activité de CFTR (HAS, 2009).

Cette corrélation est illustrée de façon relativement évidente en ce qui concerne l'atteinte pancréatique. Cette observation a été confirmée par plusieurs équipes depuis l'étude initiale de Kerem et al. (1990) qui montrait que les patients homozygotes étaient presque tous insuffisants pancréatiques, tandis que les patients hétérozygotes ne l'étaient pas (Bienvenu, 2003; Kerem et al., 1990). En outre, les formes avec insuffisance pancréatiques s'associent plus fréquemment avec les classes I, II et III, jugées « sévères », tandis que les classes IV et V comprennent des patients essentiellement suffisants pancréatiques. Ceci est bien moins précis en ce qui concerne l'atteinte respiratoire. En effet, cette dernière est d'une diversité telle, que, même en présence d'un même génotype, la symptomatologie reste propre à chaque patient. Ceci suggère que d'autres facteurs génétiques ou environnementaux sont probablement capables de moduler l'expression de l'atteinte pulmonaire. L'intervention de variants génétiques, ou gènes modificateurs, dans l'expression phénotypique de la mucoviscidose pourrait expliquer la variabilité interindividuelle de la symptomatologie, notamment respiratoire (Corvol et al., 2006). L'identification de ces gènes pourrait affiner encore la prise en charge des patients atteints de mucoviscidose dès leur dépistage, et font l'objet de recherches actives sur des gènes dits candidats.

D. Dépistage

Le dépistage néonatal de la mucoviscidose a été généralisé en France en 2002. Il s'appuie sur des marqueurs biologiques présents en période néonatale et dans les premiers mois de vie, et suit un algorithme défini par un groupe de travail constitué d'experts en 2001, évalué en 2009 par l'HAS (**Figure 7**) (HAS, 2009).

La trypsine immunoréactive (TIR) est une enzyme pancréatique dont le taux sanguin s'élève en cas de mucoviscidose. Cette augmentation résulte d'une obstruction des canaux pancréatiques par un amas de protéines *in utero*, qui a pour conséquence une libération importante de l'enzyme dans le sang. Son dosage à partir de sang séché recueilli sur papier buvard dans les premiers jours de vie permet d'orienter vers d'autres investigations diagnostiques. En effet, cette augmentation de la TIR n'est pas spécifique de la mucoviscidose et peut survenir dès lors qu'une obstruction des voies pancréatiques se manifeste.

La recherche des mutations les plus fréquemment retrouvées dans la mucoviscidose est réalisée par des techniques de biologie moléculaire. Une trentaine de mutations sont recherchées en routine, mais permettent de couvrir plus de 90% des mutations les plus fréquemment retrouvées. Cette recherche permet de confirmer ou d'infirmer le diagnostic de mucoviscidose.

Le test de la sueur consiste en la mesure de la concentration en chlorure contenu dans la sueur, après stimulation de la sudation. Il s'agit du test de référence dans le diagnostic de cette pathologie. Le test est considéré comme normal si la concentration en chlorure est inférieure à 40 mmol/L (30 mmol/L chez le nourrisson). Dans le cas de taux supérieurs ou égaux à 60 mmol/L à deux reprises, le test est considéré comme positif. Enfin, un taux compris entre 40 et 60 mmol/L conduit à un résultat

douteux et incite à contrôler le test et à rechercher d'autres arguments orientant vers une mucoviscidose.

La différence de potentiel nasal (DDP) est également un marqueur biologique de la mucoviscidose. Le défaut de sécrétion d'ion chlorure associé à l'excès de réabsorption d'ions sodium conduit à une modification du potentiel transépithélial qui peut être mesuré au niveau de la muqueuse nasale.

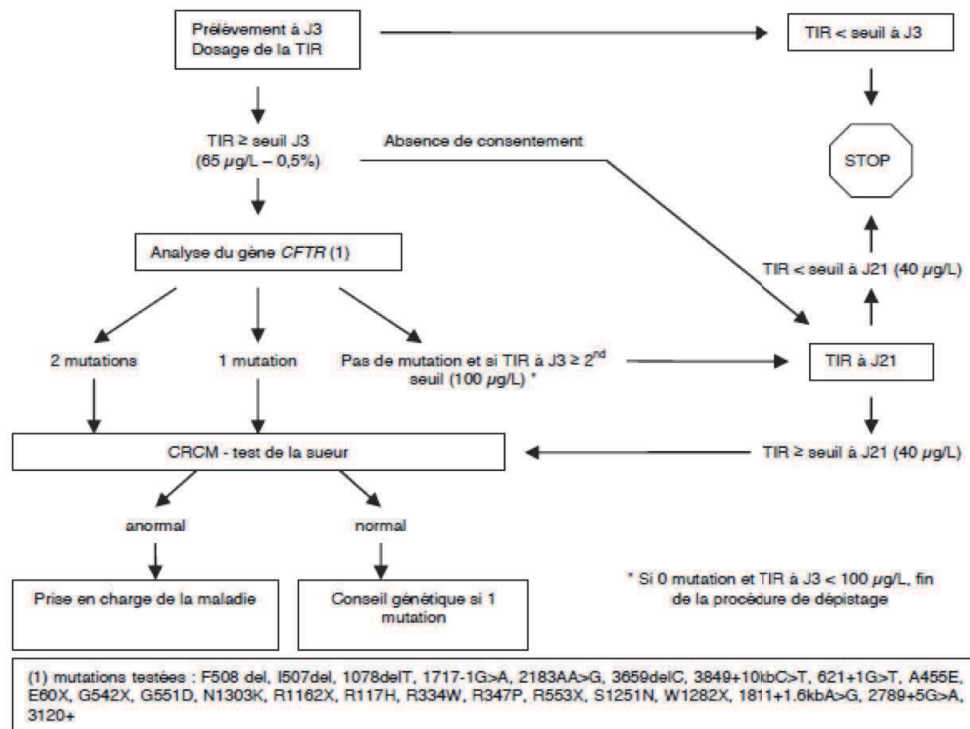


Figure 7 Algorithme de dépistage en 2008 (HAS, 2009).

L'iléus méconial reste cependant une circonstance de diagnostic classique, qui peut éventuellement survenir avant les résultats de dépistage.

Le diagnostic de mucoviscidose repose sur plusieurs éléments :

- La présence d'un ou de plusieurs signes cliniques caractéristiques (**Tableau 3**), ou des antécédents de mucoviscidose dans la fratrie, ou d'une TIR augmentée ;
- La positivité de deux tests de la sueur, ou la présence de deux mutations causales du gène CFTR, ou la présence d'une DDP nasal anormale.

Aujourd'hui, le diagnostic de mucoviscidose est de moins en moins fréquemment posé devant un tableau clinique évocateur. Il est en effet principalement réalisé dès la naissance, grâce au dépistage néonatal systématique. Il reste cependant des formes « incomplètes » ou « modérées », dont le diagnostic ne se fait que tardivement, à l'âge adulte, avec un point d'appel de dilatation des bronches ou de stérilité masculine (Férec and Scotet, 2012).

Tableau 3 Eléments du phénotype de la mucoviscidose (HAS, 2009)(Farrell et al., 2008).

<p>Maladie sino-pulmonaire chronique se manifestant par : Colonisation/infection persistante par des germes pathogènes caractéristiques de la mucoviscidose dont <i>S. aureus</i>, <i>H. influenzae</i> non typable, <i>P. aeruginosa</i> mucoïde et non mucoïde, <i>S. maltophilia</i> et <i>B. cepacia</i> Toux chronique productive Anomalies persistantes de la radiographie pulmonaire (par exemple bronchectasie, atélectasie, infiltrats, hyperinflation pulmonaire) Obstruction des voies aériennes se manifestant par sifflement (<i>wheezing</i>) et piégeage de l'air (<i>air trapping</i>) Polypes nasaux ; anomalies des sinus paranasaux identifiés par radiographie ou tomodensitométrie Hippocratisme digital</p> <p>Anomalies gastro-intestinales ou nutritionnelles dont : Intestinales : <i>ileus meconial</i>, syndrome d'obstruction intestinale distale, prolapsus rectal Pancréatiques : insuffisance pancréatique, pancréatite chronique, anomalies pancréatiques identifiées par imagerie Hépatiques : ictère néonatal prolongé, hépatopathie chronique avec aspects cliniques ou histologiques de cirrhose biliaire focale ou de cirrhose multilobaire Nutritionnelles : retard de croissance staturo-pondéral (dénutrition protéinoénergétique) ; hypoprotéïnémie et œdème, complications de déficit en vitamines liposolubles</p> <p>Syndrome de déplétion sodique : Déplétion sodique aiguë Alcalose métabolique chronique</p> <p>Anomalies urogénitales masculines entraînant une azoospermie obstructive</p>

E. Manifestations cliniques

L'expression de la maladie est variable selon les tissus et selon son stade. La grande majorité des patients atteints de mucoviscidose présentent cependant une forme dite classique, associant des signes respiratoires et une insuffisance pancréatique.

1. Manifestations respiratoires

Les manifestations respiratoires dominent fréquemment le tableau clinique et conditionnent le pronostic vital. Les infections broncho-pulmonaires, véritable métronome de la fonction respiratoire chez ces patients, seront traitées par la suite, dans un chapitre à part entière.

a) Physiopathologie respiratoire et manifestations cliniques

La cascade physiopathologique simplifiée de cette atteinte est représentée par la **figure 8**. Le dysfonctionnement de la protéine CFTR se traduit par une rétention intracellulaire de chlorure et une réabsorption du sodium et d'eau, entraînant de ce fait, une déshydratation du liquide de surface bronchique qui augmente la viscosité des sécrétions. Cette modification des propriétés rhéologiques de ce mucus devenu hypervisqueux et riche en nutriments, favorise la colonisation bactérienne. La présence d'un état d'inflammation constant, présent de façon exacerbée chez ces patients, entretient ce

cercle vicieux simplifié : obstruction-infection-inflammation. Son origine est complexe et controversée, notamment en ce qui concerne sa présence lors de la période néonatale avant toute infection (Armstrong et al., 2005; Bui et al., 2012). Ce mécanisme inflammatoire induit une bronchopneumopathie chronique obstructive, qui peut s'aggraver d'une insuffisance respiratoire chronique pouvant évoluer jusqu'au décès.

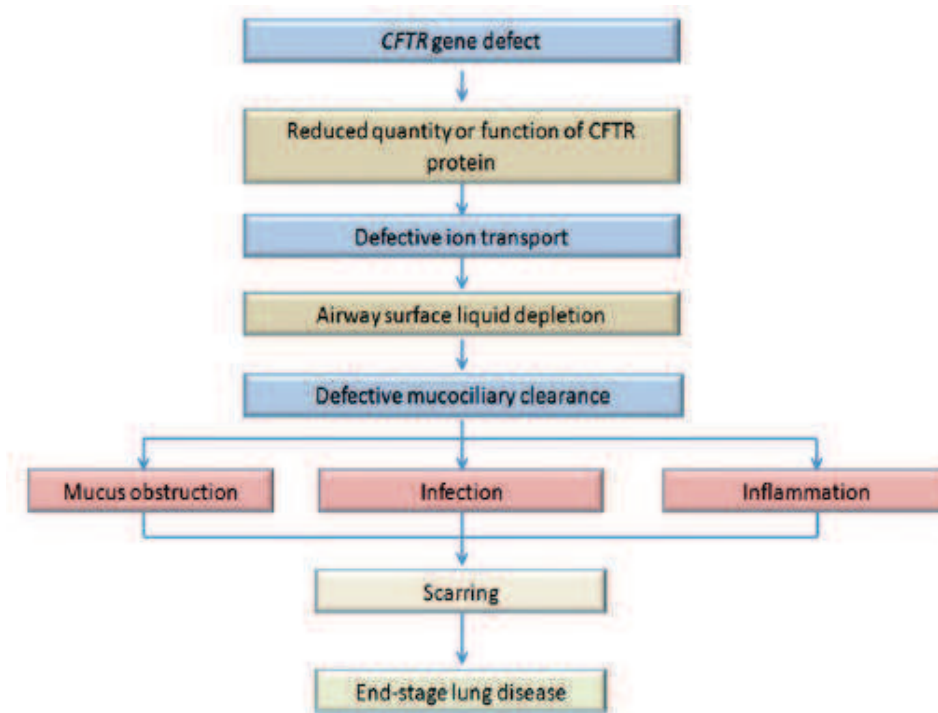


Figure 8 Cascade physiopathologique simplifiée de l'atteinte respiratoire (Lubamba et al., 2012).

La symptomatologie respiratoire est non spécifique, dominée par une toux chronique, accompagnée d'expectorations purulentes. Chez le nourrisson, la toux s'accompagne fréquemment d'une respiration sifflante, associée à des signes d'hyperréactivité bronchique et d'un encombrement bronchique. Un hippocratisme digital apparaît progressivement, ainsi qu'une dystrophie thoracique. La cyanose des extrémités peut être présente et témoigne de l'évolutivité de l'atteinte respiratoire. Par ailleurs, l'atteinte de la muqueuse des voies aériennes hautes se traduit par une pansinusite, et de façon fréquente, par une polypose nasale très évocatrice d'une mucoviscidose quand elle survient chez l'enfant.

L'évolution se fait par poussées, caractérisées par une aggravation de la symptomatologie fonctionnelle respiratoire. Elles se manifestent par une aggravation de la toux et des expectorations spontanées ou induite par la kinésithérapie. Les sécrétions sont fréquemment plus épaisses et purulentes. Parfois s'y associent une diminution de la tolérance à l'effort, une dyspnée, une asthénie, une diminution de l'appétit ou une perte de poids, voire, plus rarement, de la fièvre. Ces exacerbations

sont dues à des infections essentiellement bactériennes. Elles aboutissent à une dégradation de la fonction respiratoire, parfois irréversible.

b) Complications

Parallèlement à cette évolution qui s'aggrave progressivement, des complications peuvent survenir.

Les hémoptysies sont fréquentes chez l'adulte, notamment au stade d'insuffisance respiratoire chronique. De volume le plus souvent modéré, elles témoignent des atteintes à type de bronchectasie. Les pneumothorax peuvent également compliquer l'évolution de la maladie et sont parfois récidivants. Les abcès pulmonaires et les pleurésies purulentes sont plus rares, et doivent faire rechercher des germes plus inhabituels. Le reflux gastro-oesophagien, d'origine multifactorielle, et l'hyperréactivité bronchique sont quant à eux souvent présents. Cette dernière reste difficile à apprécier, en raison de la fréquente association de l'asthme et de la mucoviscidose. Enfin, une hypertension artérielle pulmonaire et des signes cliniques d'insuffisance cardiaque droite peuvent être retrouvées au stade terminal d'insuffisance respiratoire (Deneuille, Beucher, and Roussey, 2007; Hubert, 2008).

c) Signes radiologiques

La radiographie du thorax ne montre pas d'images spécifiques. Les lésions sont variées, diffuses, bronchiques et alvéolaires. Il existe une distension thoracique et une hyperclarté des deux champs pulmonaires. Des images d'atélectasies et d'opacités diverses peuvent être retrouvées. Le scanner permet de préciser l'intensité et l'étendue des lésions bronchiques.

d) Explorations fonctionnelles respiratoires

Les explorations fonctionnelles respiratoires (EFR) sont utiles pour le suivi des patients. La spirométrie (courbe débit-volume) permet la mesure du volume résiduel (VR), du volume expiratoire maximal seconde (VEMS) ainsi que de la capacité vitale forcée (CVF). Lors des exacerbations, on estime qu'une diminution de plus de 10% du VEMS est significative.

La plupart des patients atteints de mucoviscidose présentent un trouble ventilatoire mixte, à prédominance obstructive. Alors que la fonction respiratoire peut être normale en début de vie, des anomalies apparaissent rapidement, tout d'abord au niveau des petites voies aériennes.

Les échanges gazeux sont évalués par la mesure de la saturation en oxygène (SaO₂), ou plus rarement par la gazométrie artérielle. La recherche d'une hypoxémie ou d'une hypercapnie oriente la prescription d'oxygénothérapie. Un test d'exercice avec la mesure de la consommation maximale d'oxygène à l'effort (VO₂ max) est utile pour prescrire un réentraînement à l'exercice et aurait également une valeur pronostique.

e) Examen cyto bactériologique des crachats

L'examen cyto bactériologique des crachats (ECBC), réalisé à l'issue d'une séance de kinésithérapie respiratoire, permet la recherche des germes pathogènes et donne leur numération quantitative. Cet examen est indispensable pour caractériser les germes en cause dans les infections broncho-pulmonaires et pour évaluer leur sensibilité aux antibiotiques. Le groupe d'experts à l'origine de la conférence de consensus sur la prise en charge du patient atteint de mucoviscidose de Novembre 2002 (Société Française de Pédiatrie and ANAES, 2002b) recommande un ECBC à chaque consultation (entre 1 et 3 mois), selon l'âge du patient et la gravité de l'atteinte respiratoire. Le lavage broncho-alvéolaire (LBA) est le prélèvement de référence, mais, de part la méthode invasive qui permet de l'obtenir, ne peut être envisagée de façon répétée. Les méthodes non invasives, comme l'expectoration, ou ECBC, sont à privilégier, ou éventuellement, chez les patients ne pouvant expectorer spontanément, le recours à l'écouvillonnage pharyngé ou à l'aspiration pharyngée, qui sont des alternatives validées, malgré le risque de contamination par la flore oro-pharyngée (Société Française de Pédiatrie and ANAES, 2002b). Là réside toute la difficulté de l'obtention d'un prélèvement de qualité, qui conditionne directement l'interprétation déjà délicate des résultats d'ECBC.

Des études suggèrent que des techniques d'amplification par PCR pourraient améliorer la sensibilité et la rapidité des examens bactériologiques, mais restent encore dans le domaine de la recherche et ne sont pas utilisées en routine (Deschaght et al., 2011).

La méthode de prise en charge technique du prélèvement au laboratoire de bactériologie est relativement bien codifiée (Groupe Rémic de la Société Française de Microbiologie, 2010).

La surveillance microbiologique des colonisations pulmonaires dans la mucoviscidose est essentielle.

Les objectifs du diagnostic microbiologique sont les suivants :

- Assurer la détection précoce de la primo-colonisation à *P. aeruginosa* et aux bactéries du complexe *Burkholderia cepacia* ;
- Identifier les bactéries ou les champignons potentiellement impliqués dans la dégradation de l'état respiratoire des patients et/ou transmissibles et/ou responsables d'infections post-transplantation ;
- Donner toutes les indications utiles pour le traitement anti-infectieux.

L'analyse des prélèvements broncho-pulmonaires dans la mucoviscidose est particulièrement difficile en raison de plusieurs facteurs :

- La flore détectée est souvent plurimicrobienne. Elle comprend des espèces à croissance rapide, pouvant occulter les espèces à croissance lente, et participant aux interactions de flore ;
- Les espèces les plus couramment retrouvées (*P. aeruginosa* et *S. aureus*) peuvent présenter des caractères morphologiques (taille des colonies, pigmentation, souches mucoïdes) ou biochimiques atypiques ;

- Un certain nombre d'espèces émergentes sont difficilement identifiables en raison de leur absence dans les bases de données des systèmes commerciaux d'identification ;
- La multirésistance aux antibiotiques des bacilles non-fermentants tels que *P. aeruginosa* est enfin assez fréquente et implique des tests complémentaires, comme la recherche de synergie entre antibiotiques.

La qualité des prélèvements broncho-pulmonaires tels que l'expectoration ou l'aspiration bronchique est évaluée par la coloration de Gram, selon des critères microscopiques habituels (dénombrement des leucocytes et des cellules épithéliales). Néanmoins, quelle que soit la composition cellulaire du prélèvement, il est ensemencé pour la recherche de germes.

Le laboratoire du CHU de Rouen utilise une technique particulière de prise en charge de ces prélèvements. Le prélèvement est tout d'abord fluidifié, puis ensemencé pur et dilué au 1/1000^{ème}. Le prélèvement dilué (seuil de détection de 10⁵ UFC/ml) est destiné à être ensemencé sur deux géloses : une gélose au sang, permettant la croissance de et la détection de *Streptococcus pneumoniae* et une gélose au sang cuit pour la croissance d'*Haemophilus influenzae*. Ces géloses permettent également d'estimer la quantité de flore commensale associée. Le prélèvement pur est quant à lui ensemencé à l'écouvillon sur une gélose au sang de grande taille, permettant l'apposition secondaire des disques d'antibiotiques suivants : ticarcilline, pipéracilline, imipénème, tazocilline, colymicine, ceftazidime, ticarcilline-acide clavulanique, vancomycine, tobramycine, amikacine, aztréonam, cirpofloxacin, cotrimoxazole, fosfomycine, minocycline et rifampicine. Cette « batterie » d'antibiotiques est issue de celle destinée aux antibiogrammes des bacilles gram négatif non fermentants (sauf la vancomycine). Cet « antibiogramme direct » facilite la détection exhaustive des bactéries pathogènes dans la mucoviscidose, capable de croître sur ce type de milieu nutritif (**Figure 9**). La présence des disques d'antibiotiques permet d'isoler les différentes espèces bactériennes en fonction de leurs profils de sensibilités, ainsi que de détecter l'ensemble des phénotypes possibles au sein de chaque espèce (par exemple, la cohabitation de staphylocoques dorés méti-S et méti-R) (Lemée L et al., 2004).

Une autre technique, plus largement utilisée dans les laboratoires, préconise l'ensemencement du prélèvement sur 7 géloses différentes, avec les mêmes dilutions préalables.

Les cultures sont observées dès 24h d'incubation, puis tous les jours. La durée d'incubation est de 7 jours, pour permettre la mise en évidence des bactéries à croissance lente.

L'identification des bactéries cultivées est effectuée grâce aux caractéristiques de croissance, de tests biochimiques, parfois par génotypage, ainsi qu'à l'aide de l'étude des sensibilités. Un antibiogramme est effectué sur chaque espèce pathogène, sur chaque morphotype ou sur un mélange de différents morphotypes d'une même espèce.

La mise en évidence de mycobactéries est effectuée dans un laboratoire réservé à la culture de mycobactéries, et associe une décontamination du prélèvement, un examen microscopique, une culture, et un antibiogramme. Enfin, une recherche mycologique est réalisée, avec la mise en culture du prélèvement sur des milieux sélectifs, permettant de limiter la croissance bactérienne.

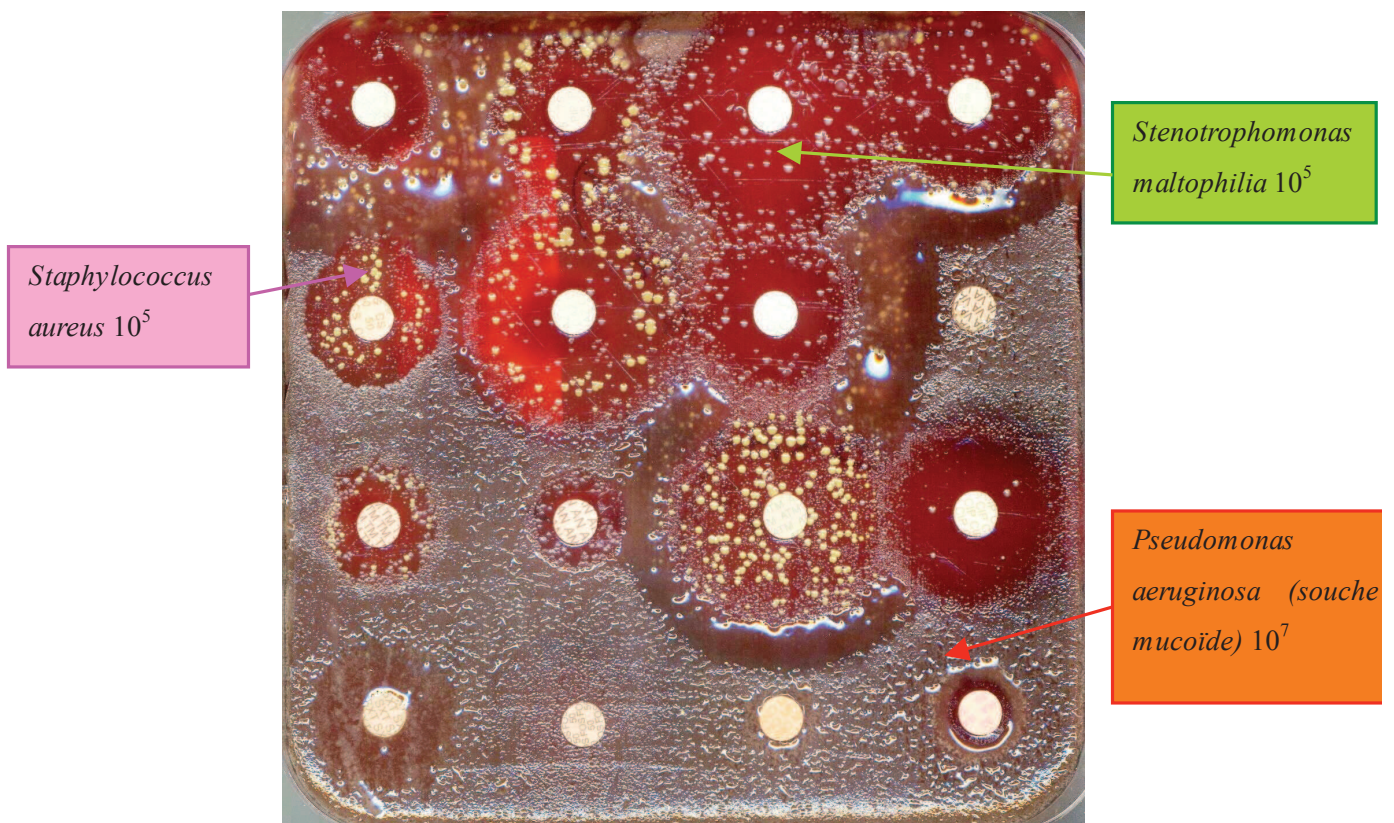


Figure 9 Exemple de détection des bactéries dans un prélèvement broncho-pulmonaire.

Plusieurs espèces sont isolées ici grâce aux disques d'antibiotiques : *Pseudomonas aeruginosa*(10^7) (souche mucoïde), *Staphylococcus aureus* (10^5) et *Stenotrophomonas maltophilia* (10^5).

2. Manifestations digestives

Les manifestations digestives de la mucoviscidose représentent la seconde atteinte la plus fréquemment retrouvée chez ces patients (Hubert, 2008; Mouterde, 2007; Ratjen and Doring, 2003; Société Française de Pédiatrie and ANAES, 2002a; Société Française de Pédiatrie and ANAES, 2002b).

a) Atteinte pancréatique

Une insuffisance pancréatique exocrine existe chez près de 80% des patients. Elle est fréquemment présente dès l'enfance et est révélée par le dosage de l'élastase fécale (effondrée dans l'insuffisance pancréatique externe, taux $< 200\mu\text{g/g}$ de selles). Son traitement consiste en la prise d'une supplémentation en extraits pancréatiques. Des poussées de pancréatite aigue sont possibles, essentiellement chez les patients suffisants pancréatiques.

Un diabète peut apparaître, surtout chez l'adulte, en raison de la destruction progressive des îlots de Langerhans par une fibrose du pancréas. L'hyperglycémie provoquée par voie orale permet le

dépistage de celui-ci et est effectuée de façon annuelle. L'apparition d'un diabète a une valeur pronostique péjorative, et expose les patients à de nouvelles complications.

b) Atteinte gastro-intestinale

L'iléus méconial est une circonstance de diagnostic chez 10 à 15% des patients. A l'âge adulte, un iléus stercoral peut survenir entraînant un syndrome d'obstruction intestinale, associé à de violentes douleurs abdominales.

c) Atteinte hépato-biliaire

L'atteinte hépatique est surtout l'apanage de l'âge adulte. Elle se traduit par une hépatomégalie et une cholestase biologique. Une cirrhose associée à une hypertension portale concerne 5 à 8% des patients. L'atrophie de la vésicule biliaire est fréquente, et les lithiases vésiculaires augmentent avec l'âge.

d) Troubles nutritionnels

De nombreuses causes sont à l'origine de carences nutritionnelles chez les patients atteints de mucoviscidose. L'insuffisance pancréatique entraîne une malabsorption des graisses ; l'inflammation bronchique est un important consommateur de calories. A cela s'ajoute une fréquente perte d'appétit qui accroît les carences caloriques, lipidiques et vitaminiques.

3. Manifestations génitales

La puberté est retardée dans les deux sexes. En raison d'une azoospermie obstructive par atrésie bilatérale des canaux déférents, les hommes sont stériles dans plus de 95% des cas. Les femmes ne présentent pas d'anomalies morphologiques de l'appareil génital, mais peuvent néanmoins avoir une fertilité diminuée en raison d'un épaissement de la glaire cervicale.

4. Manifestations autres

Les autres manifestations cliniques de la mucoviscidose sont essentiellement ORL, rhumatologiques, allergiques et cardiovasculaires (Hubert, 2008).

a) Atteinte ORL

Elle est quasi-constante. Les rhinopharyngites et les sinusites chroniques accompagnent les manifestations respiratoires. Une polypose nasosinusienne concerne 20% des patients.

b) Atteinte rhumatologique

Les arthralgies peuvent survenir dans l'évolution de la maladie, possiblement en rapport avec des mécanismes immunologiques. L'ostéoporose est de plus en plus préoccupante, en raison d'un allongement de la durée de vie. L'ostéodensitométrie ainsi que des bilans phosphocalciques permettent de suivre l'évolution de l'ostéoporose.

c) Manifestations allergiques

Elles sont fréquentes et compliquent parfois la prise en charge thérapeutique, notamment en terme d'antibiothérapie.

d) Atteinte cardiovasculaire

Les manifestations cardiaques sont essentiellement secondaires à l'insuffisance respiratoire, et se manifestent de ce fait, surtout à l'âge adulte.

F. Prise en charge thérapeutique

La prise en charge thérapeutique est désormais coordonnée au sein des Centres de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose (CRCM), situés en milieu hospitalier, depuis la circulaire du 22 octobre 2001 (Ministère de la solidarité et de l'emploi and Direction de l'hospitalisation et de l'organisation des soins, 2001). Il s'agit de centres mixtes, pédiatriques ou adultes. Il existe actuellement 64 CRCM qui prennent en charge les patients atteints de mucoviscidose grâce à des équipes pluridisciplinaires regroupant médecins, infirmières, kinésithérapeutes, coordonnateurs, psychologues, assistantes sociales, et agissant en interactions avec d'autres professionnels hospitaliers pouvant intervenir de façon spécialisée (ORL, gastro-entérologue, diabétologue, rhumatologue, spécialiste de la reproduction, chirurgien thoracique...), ainsi qu'avec les équipes médicales « de ville » (médecins traitants, infirmiers, kinésithérapeutes...). Les patients sont ainsi suivis en consultation, à un rythme moyen trimestriel, avec la possibilité de consulter à la demande, en cas de besoin. Un bilan annuel complet est réalisé en hôpital de jour. Les hospitalisations sont effectuées en cas d'exacerbations respiratoires, de complications et de cures antibiotiques, lorsque celles-ci ne peuvent être faites à domicile.

La prise en charge est ainsi globale et concerne tous les aspects de la pathologie.

1. Prise en charge respiratoire

La prise en charge respiratoire a été l'objet d'une conférence de consensus publiée en 2002, qui répond aux questions les plus délicates et oriente les décisions thérapeutiques (Société Française

de Pédiatrie and ANAES, 2002b). Elle repose principalement sur la kinésithérapie, l'aérosol-thérapie et l'antibiothérapie.

a) Kinésithérapie

Elle est instaurée de façon systématique dès le diagnostic de mucoviscidose. Selon l'âge, sa fréquence varie, mais devient quotidienne assez rapidement. Les objectifs recherchés de la kinésithérapie à visée respiratoire sont l'amélioration de la ventilation, de la clairance ciliaire et des échanges gazeux par la diminution de l'obstruction bronchique, et ainsi, du ralentissement de l'évolution de la maladie au niveau respiratoire (Reychler G. and C., 2009).

b) Principes généraux de l'antibiothérapie

L'antibiothérapie est un élément essentiel dans la prise en charge du retentissement respiratoire de la pathologie (Société Française de Pédiatrie and ANAES, 2002b; Yankaskas et al., 2004). En effet, la survenue précoce et régulière d'infections bactériennes essentiellement, se surajoute à la colonisation bronchique chronique que présentent ces patients. Les premiers germes incriminés sont *Staphylococcus aureus* et *Haemophilus influenzae*, avant la survenue, de quelques mois à quelques années plus tard, d'une fréquente colonisation à *Pseudomonas aeruginosa*, qui marque un tournant dans l'évolutivité de la pathologie.

Les principes généraux de l'antibiothérapie reposent sur l'adaptation des posologies et de la durée de traitement en fonction de la sensibilité des germes retrouvés et des caractéristiques pharmacocinétiques propres à chaque patient. En outre, le volume de distribution par kilogramme de poids corporel étant augmenté, au contraire d'une demi-vie d'élimination diminuée, associés à une élimination rénale et non rénale plus importante, incite à une adaptation des posologies en fonction des molécules utilisées (Société Française de Pédiatrie and ANAES, 2002b; Spino, 1991)(Sermet-Gaudelus et al., 2000). La viscosité accrue du mucus entraîne de plus une difficulté de pénétration des antibiotiques au niveau pulmonaire, donnant ainsi un argument en faveur d'une augmentation des posologies. Cependant, la prise répétée et sur de longues durées d'antibiothérapies justifie une surveillance accrue des toxicités éventuelles, comme des dosages plasmatiques selon les antibiotiques utilisés. Enfin, la forte prévalence des allergies aux β -lactamines au sein des patients atteints de mucoviscidose peut compliquer la prescription.

Les recommandations françaises s'appuient essentiellement sur des pratiques d'experts, et non sur des essais validés. Le recours à l'antibiothérapie concerne essentiellement, de par leur fréquence, *S. aureus* et *P. aeruginosa*. Elle vise d'une part les épisodes d'exacerbation, et d'autre part, l'antibioprophylaxie secondaire. La prophylaxie primaire n'est pas recommandée à ce jour en France. En ce qui concerne *P. aeruginosa*, la primocolonisation doit faire l'objet d'une tentative d'éradication du germe, afin de retarder le passage à la chronicité (Société Française de Pédiatrie and ANAES, 2002b), ce qui n'est pas le cas de *S. aureus*.

La voie d'administration des antibiotiques est principalement orale, parfois parentérale en cas de cures anti- *P. aeruginosa*, qui utilisent des antibiotiques administrés par voie intraveineuse, ou en cas d'infections sévères. La réalisation des cures à domicile est privilégiée, afin d'améliorer le confort des patients, grâce à la mise à disposition de diffuseurs portables, voire de mise en place de chambres implantables, ayant l'avantage de préserver le capital veineux déjà très sollicité de ces patients. De plus, certains antibiotiques sont prescrits par voie inhalée, comme la colymicine et la tobramycine, utilisées contre *P. aeruginosa*. Enfin, l'azithromycine est donnée de façon prolongée, notamment pour ses actions anti-inflammatoires, sur le canal CFTR et sur les facteurs de virulence de *P. aeruginosa* (Equi et al., 2002).

Les modalités de prise en charge des infections respiratoires dans la mucoviscidose rencontrent une difficulté en terme d'uniformisation des pratiques, en raison du manque d'études concluantes sur ce sujet. Les choix thérapeutiques dans le domaine de l'antibiothérapie seront plus amplement détaillés dans un chapitre suivant.

c) L'aérosol-thérapie et les thérapies inhalées

Les corticoïdes inhalés ou par voie orale peuvent avoir une place dans la thérapie broncho-pulmonaire. Ils sont essentiellement indiqués en cas d'aspergillose broncho-pulmonaire allergique ou d'asthme.

La rh-DNase recombinante humaine (Pulmozyme ®) est utilisée comme fluidifiant, de par son action hydrolytique sur l'ADN extracellulaire présent en concentration élevée dans les sécrétions bronchique (Fuchs et al., 1994). Les bronchodilatateurs de type β -2-mimétiques peuvent être prescrits en cas d'exacerbation ou au long court, en fonction des symptômes cliniques propres à chaque patient, en vue d'améliorer les paramètres fonctionnels respiratoires.

d) La transplantation pulmonaire

L'évolution naturelle de la mucoviscidose est émaillée par des décompensations respiratoires, dont l'issue peut être fatale. Le développement de la ventilation non invasive et de la transplantation pulmonaire ont permis d'améliorer la survie des patients en insuffisance respiratoire terminale. La transplantation est le dernier recours thérapeutique en cas d'atteinte respiratoire grave et évolutive, mais requiert la prise en compte des risques inhérents à cette opération lourde. Les facteurs retenus pour admettre ces patients sur la liste de transplantation sont les suivants : un VEMS inférieur à 30% associé à une hypercapnie ($\text{PaCO}_2 > 50 \text{ mmHg}$), une antibiodépendance ou une antibiorésistance (Pellau et al., 2012). L'infection respiratoire n'est pas une contre-indication à la greffe, mais représente un facteur de risque de morbi-mortalité post-transplantation. Le pronostic est en outre plus défavorable lors d'une colonisation due à *Burkholderia cepacia*, et plus précisément au gemovar III, en raison d'un risque de mortalité accru (Boussaud et al., 2008).

2. Prise en charge digestive

La prise en charge de la symptomatologie digestive comprend essentiellement une supplémentation enzymatique et vitaminique et un régime adapté à la dénutrition fréquemment associée dans cette pathologie (Société Française de Pédiatrie and ANAES, 2002b). La compensation de l'insuffisance pancréatique exocrine repose sur les extraits pancréatiques gastro-résistants. La supplémentation vitaminique concerne les vitamines liposolubles A, D, E, éventuellement K, et certains oligo-éléments (fer, zinc, sélénium, magnésium) lorsqu'une carence de ces derniers est révélée. Le maintien d'un état nutritionnel optimal contribue à améliorer le pronostic vital et repose sur des démarches diététiques adaptées à chaque patient. Le régime alimentaire préconisé est habituellement hypercalorique, hyperprotidique et normolipidique.

Le traitement de l'atteinte hépato-biliaire repose sur l'acide ursodésoxycholique (AUDC) qui augmente la sécrétion biliaire et retarde l'évolution vers la cirrhose.

Enfin le traitement du diabète entraîne le recours à l'insulinothérapie, voire aux antidiabétiques oraux, en associant un suivi régulier de la glycémie, chez ces patients dont les régimes alimentaires classiquement préconisés chez les patients diabétiques ne sont pas adaptés.

3. Recherche thérapeutique

Les pistes de recherche thérapeutique pour l'amélioration de la survie des patients atteints de mucoviscidose sont multiples et concernent de nombreuses équipes de recherche.

La recherche fondamentale est indispensable pour la découverte de cibles thérapeutiques, en permettant une meilleure connaissance des mécanismes physiopathologiques de la mucoviscidose.

D'autre part, la recherche clinique s'appuie sur ces connaissances pour développer des outils thérapeutiques à visée symptomatique, ainsi que pour tenter d'agir au sein même du gène (thérapie génique) ou sur la protéine CFTR. Récemment, en janvier 2012, ce dernier aspect d'axe de recherche a permis d'initier un traitement potentialisateur de la protéine CFTR chez les patients présentant la mutation G551D (Davis, Ysothan, and Kirkpatrick, 2012).

G. Evolution et pronostic

Bien plus que des démonstrations par l'intermédiaire d'études, l'augmentation indéniable de l'espérance de vie et du nombre d'adultes chez les patients atteints de mucoviscidose, reflète les considérables progrès réalisés en terme de prise en charge (**Figure 10**).

Cette pathologie n'en reste pas moins incurable à ce jour, et les données de morbidité traduisent la gravité des nombreuses atteintes cliniques chez ces patients. En effet, l'augmentation de l'espérance de vie s'accompagne de complications multiples liées à la maladie elle-même ou à ses traitements.

Une de ces atteintes, certainement la plus lourde en terme de symptomatologie clinique et des complications graves qui en découlent, ainsi qu'en terme de thérapeutique, est l'atteinte respiratoire. Elle est principalement la conséquence des infections multiples et chroniques qui s'installent dès la plus petite enfance, sur ce terrain qui semble prédisposé par les désordres moléculaires dus aux anomalies de la protéine CFTR.

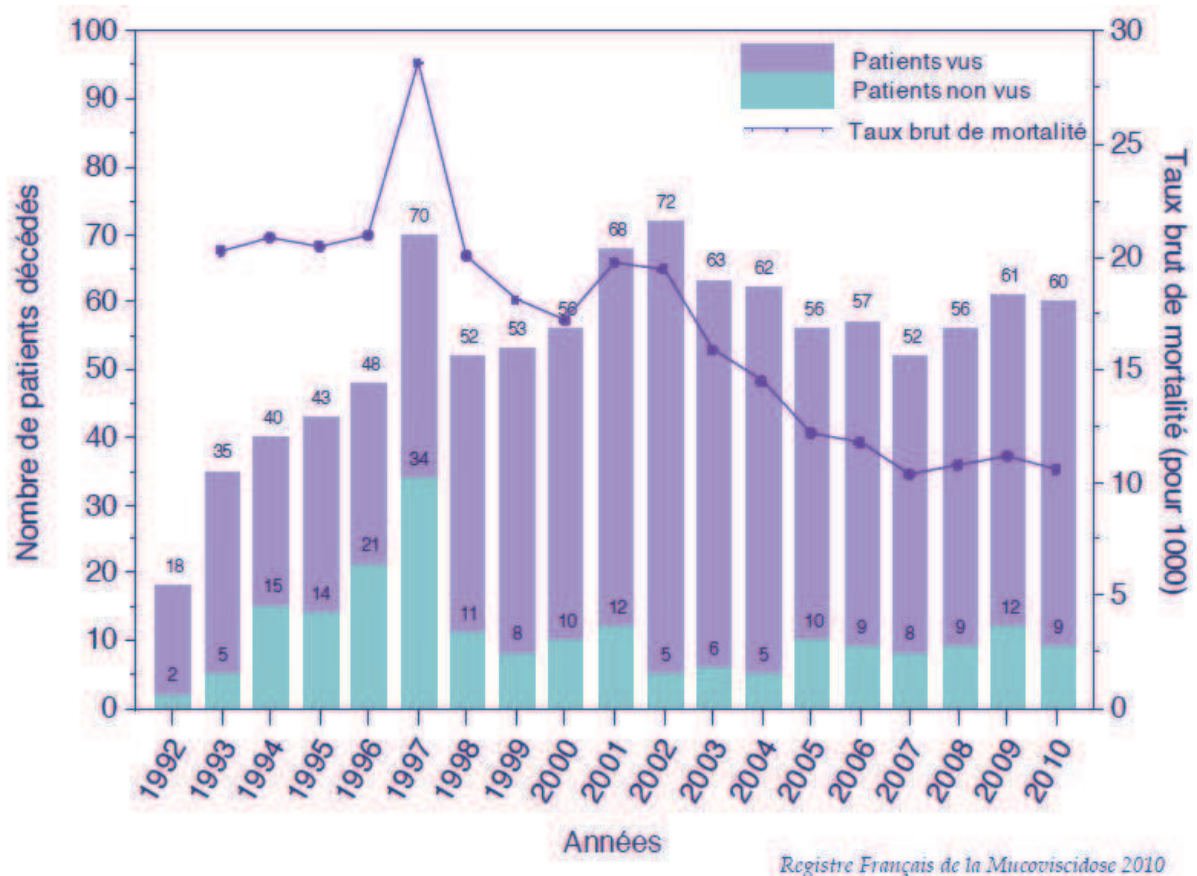


Figure 10 Nombre de décès au cours de l'année 2010 et évolution depuis 1992 (Vaincre la Mucoviscidose and Ined, 2010b)

II. Les infections respiratoires dans la mucoviscidose

Les infections respiratoires conditionnent la qualité de vie et l'évolution de la maladie. Les pathogènes mis en cause sont bactériens, fongiques et viraux. Ils peuvent coloniser simplement l'arbre bronchique, ou réaliser une véritable infection. Elle débute par un mode transitoire, avant de devenir fréquemment chronique, selon les pathogènes. Ces derniers sont rarement isolés et cohabitent ensemble, rendant leur implication individuelle difficile à identifier, et donc, à traiter spécifiquement.

A. Infections bactériennes

La colonisation bactérienne intervient très tôt dans l'histoire naturelle de la maladie (**Figure 11**). Les premières bactéries colonisatrices de l'arbre bronchique chez les patients atteints de mucoviscidose sont classiquement *Haemophilus influenzae*, dès la première année de vie, ainsi que *Staphylococcus aureus*. La fréquence d'isolement de *Pseudomonas aeruginosa* augmente ensuite avec l'âge, et tend à surpasser celle de *S. aureus*. *P. aeruginosa* et *S. aureus* sont les deux bactéries les plus fréquemment retrouvées, présentes chez 42,9% et 62,5% respectivement des patients suivis dans les CRCM en 2010 (Vaincre la Mucoviscidose and Ined, 2010b). Une étude prospective, menée sur les lavages broncho-alvéolaires de 40 enfants âgés de 15 mois au plus, a montré que les infections bactériennes survenaient dès le plus jeune âge et étaient souvent pluri-microbiennes (Rosenfeld et al., 2001). D'autres bactéries sont également retrouvées de façon plus rare, mais tendent à devenir de plus en plus fréquentes, probablement en raison de meilleures techniques d'identification. Il s'agit du complexe *Burkholderia cepacia*, infectant une minorité d'adultes, de *Stenotrophomonas maltophilia*, de *Achromobacter xylosoxidans*, ainsi que des mycobactéries atypiques. Enfin, une part incontestable de germes restent méconnus, en raison de leur non-identification par les automates et les méthodes de laboratoire conventionnelles, ainsi que par leurs exigences de culture (Hauser et al., 2011).

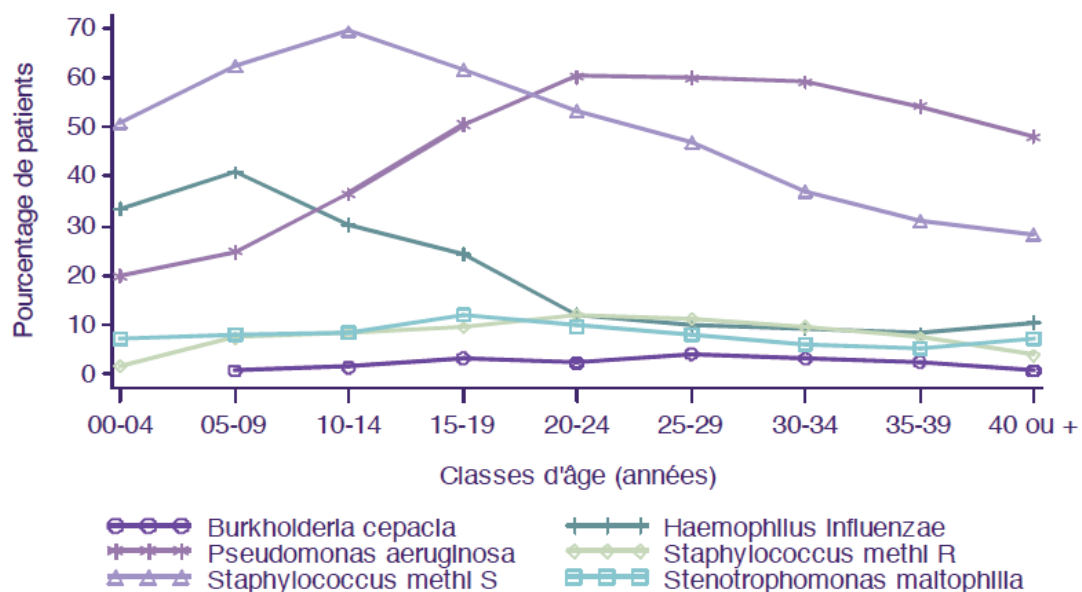


Figure 11 Bactéries cliniquement importantes dans la mucoviscidose (Vaincre la Mucoviscidose and Ined, 2010b).

Une des difficultés la plus fréquente dans l'étude de la microbiologie de la mucoviscidose, est la capacité d'affecter un rôle pathogène propre à une bactérie en particulier, et donc, de pouvoir traiter spécifiquement la cause de l'infection. En premier lieu, certaines bactéries étant présentes à l'état commensal dans les voies aériennes supérieures, il reste difficile, notamment chez les patients les plus

jeunes, d'obtenir des prélèvements non-invasifs non contaminés par cette flore oropharyngée. En second lieu, la présence probable de bactéries non-identifiées ou non-cultivées peut interférer dans cette identification de la bactérie pathogène. Enfin, la présence de ces bactéries ne détermine pas systématiquement une infection. Les colonisations sont communes dans la mucoviscidose, sans pour autant déclencher un véritable tableau infectieux, ce qui amène à préciser quelques définitions. Ces définitions sont fondées sur le Consensus Européen de l'année 2000 de l'antibiothérapie contre *P. aeruginosa* (Doring et al., 2000).

La colonisation chronique est la présence du germe pendant au moins 6 mois, avec au moins 3 cultures positives à au moins un mois d'intervalle, sans manifestations cliniques ou présence d'une sérologie positive lorsqu'elle existe, signant une infection.

L'infection bronchopulmonaire correspond aux situations où la bactérie est présente, avec des signes directs (manifestations cliniques) ou indirects (sérologie) d'infection. Elle peut résulter d'une primocolonisation ou être chronique.

L'exacerbation est la survenue d'un épisode aigu de détérioration clinique sur un état stable : majoration de la toux, augmentation de l'expectoration, diminution de la tolérance à l'effort ou du niveau d'activité physique, perte de poids ou d'appétit, altération de la fonction respiratoire (VEMS, CVF) ou augmentation franche de la charge bactérienne d'un prélèvement à l'autre, dans le cadre d'un suivi systématique.

Pour simplifier la lecture de cette partie bibliographique du mémoire, le terme « infection » sera par la suite utilisé de façon courante, sauf précisions le cas échéant, représentant l'acquisition simple d'un germe potentiellement pathogène, quelle que soit la présence manifeste de signes d'infection.

La physiopathologie de l'infection broncho-pulmonaire dans la mucoviscidose a suggéré de nombreuses études, notamment en ce qui concerne l'implication de *P. aeruginosa* dans ce processus. Il semblerait que les anomalies génétiques à l'origine de cette pathologie, permettent la persistance de certains germes, en particulier de *P. aeruginosa*, le plus étudié à l'heure actuelle, profitant d'une réponse inflammatoire disproportionnée mais inefficace, entraînant une destruction progressive des tissus pulmonaires. Certaines hypothèses ont été avancées, comme le défaut de clairance des germes en raison de l'hyperviscosité du mucus (Matsui et al., 1998). De même, la protéine CFTR, qui exposerait des molécules permettant l'internalisation du bacille pyocyanique et ainsi sa destruction ultérieure, étant diminuée ou non-fonctionnelle, permettrait la persistance de la bactérie (Pier, 2000; Pier et al., 1996). Le rôle de l'inflammation est également étudié, en raison de sa présence exacerbée chez ces patients. L'infiltration massive de polynucléaires neutrophiles observée dans les tissus pulmonaires, ainsi que l'excès de cytokines pro-inflammatoires seraient à l'origine de la destruction des cellules hôtes de façon inappropriée (Konstan and Berger, 1997).

L'acquisition d'un micro-organisme peut provenir de l'environnement, surtout en ce qui concerne des bactéries dont les réservoirs naturels sont variés, comme *P. aeruginosa*, ou provenir

d'autres patients, par contact direct ou indirect. Chaque bactérie a des caractéristiques propres d'évolution dans le tractus respiratoire de ces patients, mais il semble qu'elles suivent globalement toutes le chemin de l'adaptation à leur hôte, développant des mécanismes originaux, leur permettant de persister de façon chronique.

1. Haemophilus influenzae

Haemophilus influenzae est une bactérie commensale retrouvée communément dans les voies aériennes supérieures, mais pouvant potentiellement être à l'origine d'infections variées. Chez les patients atteints de mucoviscidose, cette bactérie est le plus souvent non-capsulée, et donc non couverte par le vaccin anti-*Haemophilus influenzae b* (Hib). Son pouvoir pathogène dans l'infection respiratoire dans la mucoviscidose reste controversé. En effet, sa présence à l'état commensal dans les voies respiratoires rend délicate son implication dans la symptomatologie respiratoire. Son rôle dans les exacerbations semble quant à lui plus probable (Rayner et al., 1990) et inciterait à instaurer un traitement adapté dans ces situations. Enfin, il semblerait que cette bactérie développe des caractéristiques particulières lui permettant de s'adapter aux conditions inhospitalières des voies respiratoires des patients. Des souches « hypermutatrices » présentent des mutations dans le gène *mutS* leur conférant un avantage de survie et l'acquisition de résistances aux antibiotiques (Watson, Burns, and Smith, 2004), ou encore la formation d'un biofilm (Cardines et al., 2012).

2. Staphylococcus aureus

a) Epidémiologie

Staphylococcus aureus est une autre bactérie couramment retrouvée dans les prélèvements bronchiques des patients atteints de mucoviscidose, même si son habitat naturel chez l'homme est généralement la peau et le nez. Elle a été la première bactérie à avoir été désignée comme responsable d'infections pulmonaires chez les patients atteints de mucoviscidose, et, avant l'avènement des antibiotiques, de la majeure partie des décès chez ces patients. La fréquence d'isolement de la bactérie est la plus importante de tous les autres germes chez les patients atteints de mucoviscidose, et atteint 62, 5%, avec 53,5% de *Staphylococcus aureus* méticilline sensible (SAMS) et 8% de *Staphylococcus aureus* méticilline résistant (SAMR), en 2010 en France (Vaincre la Mucoviscidose and Ined, 2010b). Dans une étude menée par Rosenfeld et al. sur les LBA de 141 enfants âgés de moins de 5 ans, près de 50% de ces enfants étaient infectés à *S. aureus* dès leurs 6 premiers mois de vie (Rosenfeld et al., 1999), montrant la précocité et la forte prévalence de la présence de cette bactérie chez ces patients. Cette fréquence d'isolement a en outre augmenté depuis ces dix dernières années (Emerson et al., 2010), tout en étant parallèle à une augmentation de la prévalence des SAMR, qui reste néanmoins inférieure à celle retrouvée aux Etats Unis (25,7% des patients en 2010) (Goss and Muhlebach, 2011).

Cette augmentation a cependant attiré l'attention sur ce germe, dont le rôle dans la symptomatologie pulmonaire reste controversé.

b) Critères diagnostiques de l'infection bronchopulmonaire à *S. aureus*

Les critères diagnostiques de l'infection respiratoire à *S. aureus* comprennent des critères cliniques et microbiologiques (Société Française de Pédiatrie and ANAES, 2002b).

- Cliniques : la notion clinique d'exacerbation est indispensable au diagnostic d'infection à *S. aureus*, sachant que les critères cliniques ne sont pas spécifiques de la bactérie.
- Microbiologiques : le portage asymptomatique possible de *S. aureus* complique la mise en évidence de critères diagnostiques d'une primocolonisation. Un seuil de 10^2 UFC/ml de prélèvement (ECBC ou LBA) est proposé dans les recommandations françaises de prise en charge des infections respiratoires du patient atteint de mucoviscidose. Concernant la définition de l'infection à *S. aureus*, un seuil supérieur à 10^5 UFC/ml dans le prélèvement incite le clinicien à rechercher des signes cliniques ou fonctionnels d'exacerbation. C'est la coexistence d'une exacerbation et de la présence de *S. aureus* dans le prélèvement qui atteste d'une infection à *S. aureus*.

c) Rôle du SAMS dans la pathologie respiratoire

A la table des bactéries commensales des voies aériennes supérieures, *S. aureus* s'invite de façon fréquente, sans pour autant pouvoir être qualifié de tel, constituant plutôt un portage asymptomatique. La qualité du prélèvement est en ce sens essentielle, pour pouvoir interpréter le plus aisément possible la présence de la bactérie dans les voies aériennes inférieures. Son potentiel à coloniser l'arbre bronchique des patients atteints de mucoviscidose n'en reste pas moins important, ne constituant pourtant pas une preuve de sa pathogénicité, ce qui en fait toute la controverse de son impact réel sur la fonction respiratoire de ces patients.

Dès les premières utilisations des sulfamides et de la pénicilline dans la prise en charge des patients atteints de mucoviscidose, une amélioration de la survie a été observée (Andersen, 1949), suggérant *a priori* l'implication de la bactérie dans la symptomatologie de la maladie. Le rôle de la bactérie a en outre été étudié en ce qui concerne sa relation avec l'état inflammatoire retrouvé chez ces patients (Kahl, 2010). Une étude prospective, menée chez 42 enfants inclus dès le diagnostic de mucoviscidose, a montré que la présence de la bactérie et un état inflammatoire évalué dans les LBA de ces enfants, étaient associés à un statut nutritionnel moins optimal (Ranganathan et al., 2011). Une étude prospective australienne, regroupant 70 enfants à leur diagnostic de mucoviscidose, a pu faire ressortir une relation étroite entre la présence indépendante de bactéries (*P. aeruginosa* et *S. aureus*) ou de virus et un haut niveau d'inflammation observée dans leurs LBA, au contraire des patients non-

infectés et de cas contrôle sains (Armstrong et al., 2005). L'analyse des LBA de 111 enfants atteints de mucoviscidose âgés de moins de 6 ans, dans le but de rechercher l'implication de *P. aeruginosa* et *S. aureus* dans l'inflammation des voies respiratoires de ces patients a permis de confirmer l'étude de Armstrong et al. de 2005. En effet, la présence de *S. aureus* seul dans les voies respiratoires basses aurait un effet délétère en accentuant les marqueurs de l'inflammation, ainsi qu'un effet additionnel sur la genèse de cette inflammation déjà initiée par la présence de *P. aeruginosa* (Sagel et al., 2009). La capacité de *S. aureus* à adhérer aisément à l'épithélium respiratoire grâce, notamment à un composant de sa paroi (acide téichoïque), et sa facilité à échapper au système de défense de son hôte attestent de sa relative virulence. Il peut ainsi réaliser des infections chroniques, qui précèdent souvent la colonisation à *P. aeruginosa*. *S. aureus* préparerait l'installation du bacille pyocyanique en déclenchant une réaction inflammatoire à l'origine de dommages au sein de l'épithélium bronchique, permettant de démasquer ainsi les récepteurs épithéliaux de ce dernier (Hauser et al., 2011; Mariani-Kurkdjian and Bingen, 2003). D'autre part, la présence de *S. aureus* seul aurait un impact délétère sur la fonction respiratoire, mais n'affecterait pas la survie des patients, tandis que sa présence associée à celle de *P. aeruginosa* la diminuerait (Hudson, Wielinski, and Regelman, 1993). Les auteurs concluent que ces deux bactéries contribuent indépendamment et additionnellement à la détérioration de la fonction respiratoire. D'autres observations ont au contraire montré que *S. aureus* n'aurait qu'un faible impact sur le déclin de la fonction respiratoire, voire même un possible effet protecteur vis à vis de l'acquisition de *P. aeruginosa* (Huang et al., 1987; Smyth, 2005; Stutman et al., 2002), notamment en raison de la sélection du bacille pyocyanique en cas de traitements anti-staphylococciques prolongés (Ratjen et al., 2001).

Bien que l'impact de *S. aureus* sur la dégradation de la fonction respiratoire reste controversé et souffre d'un manque de preuve en raison de la difficulté de mener des études méthodologiquement sans failles et comparables dans le domaine de la mucoviscidose, l'hypothèse de son rôle délétère lors d'infections chroniques a justifié les recommandations de traiter les patients infectés (Société Française de Pédiatrie and ANAES, 2002b). En outre, dans la pratique courante, les cliniciens doutent peu de l'effet pathogène net de la présence de *S. aureus* chez leurs patients, qu'il s'agisse de SAMS ou de SAMR. L'augmentation de la prévalence des SAMR a de plus orienté les études sur le rôle de cette bactérie multi-résistante dans la mucoviscidose.

d) Rôle du SAMR dans la pathologie respiratoire

La prévalence des SAMR chez les patients atteints de mucoviscidose n'a en effet pas échappé à l'augmentation globale de cette bactérie dans le monde. Elle reste néanmoins inférieure en France (8% en 2010) que dans d'autres pays, notamment aux Etats Unis (25,7% en 2010) (Cystic Fibrosis Foundation, 2010; Goss and Muhlebach, 2011; Vaincre la Mucoviscidose and Ined, 2010b). Le pic de fréquence se situe chez le jeune adulte, entre les âges de 18 et 24 ans (Vaincre la Mucoviscidose and Ined, 2010b). L'implication de l'infection à SAMR en opposition avec celle à SAMS reste débattue,

mais des études récentes tendent à montrer que la présence de SAMR est reliée à une fonction respiratoire plus altérée. Dasenbrook et al. ont étudié les données de l'American Cystic Fibrosis Foundation de 1996 à 2005 de 17357 patients. Ils ont observé un déclin statistiquement plus rapide de la fonction respiratoire chez les patients infectés à SAMR en comparaison à ceux non-infectés à SAMR, chez des patients âgés de 8 à 21 ans (Dasenbrook et al., 2008). Dans le même sens, une étude comparant SAMR et SAMS a montré un plus faible niveau de VEMS (80,7% pour SAMR *versus* 89,4% pour SAMS), un plus grand volume de traitements antibiotiques et une plus grande fréquence d'hospitalisation pour les patients infectés à SAMR (Ren et al., 2007). Enfin une étude plus récente corrobore ces constatations, en concluant à une atteinte plus prononcée de la fonction pulmonaire chez les patients infectés à SAMR, ainsi qu'une association avec le génotype $\Delta F508$, une insuffisance pancréatique plus marquée, une plus grande fréquence de bronchectasies et un plus grand nombre d'hospitalisations chez ces patients (Vanderhelst et al., 2012). Le rôle du SAMR dans l'évolution défavorable de la fonction respiratoire semble donc moins controversé que pour le SAMS, mais reste cependant non acquis de façon certaine, en raison de la difficulté à pouvoir comparer des études utilisant des groupes de patients différents, tant par leurs taille, l'âge des individus, le type d'infection concerné et l'utilisation quasi permanente d'antibiothérapies pouvant aisément introduire de nombreux biais dans ces études (Kahl, 2010).

Le mode d'acquisition du SAMR, fréquemment relié à un séjour hospitalier où sa prévalence est majoritaire, tend à se modifier en raison de l'émergence de SAMR communautaires (SAMR-C). Ceux-ci diffèrent des SAMR hospitaliers (SAMR-H) par leur type de cassette *SCCmec* qui porte le gène de la résistance à la méticilline (le plus souvent, type IV à VIII pour les SAMR-C et types I, II ou III pour les SAMR-H) (Elizur et al., 2007), par une moindre résistance aux différentes classes d'antibiotiques, et par l'expression plus fréquente de la leucocidine de Pantone Valentine (LPV), possiblement responsable de pneumopathies nécrosantes. La virulence potentiellement accrue des SAMR-C pourrait jouer un rôle délétère sur la fonction respiratoire des patients atteints de mucoviscidose (Elizur et al., 2007).

e) Adaptation de *S. aureus*

Lorsque *S. aureus* infecte de façon chronique certains patients atteints de mucoviscidose, il apparaît que la bactérie développe des caractéristiques originales, traduisant une adaptation à son environnement. Plusieurs stratégies adaptatives de cette bactérie versatile ont été évoquées : variant à petites colonies (SCVs), phénotype hypermutateur, formation de biofilms (Molina et al., 2008), extinction de gènes de virulence, ou encore une hétérogénéité de la population (Goerke and Wolz, 2010). Le concept de variants à petites colonies décrit des morphologies de colonies de petite taille, à croissance plus lente (Freney et al., 2000; Goss and Muhlebach, 2011; Hauser et al., 2011). Un défaut de transport d'électron, serait à l'origine de ce phénotype plus adapté au domaine intracellulaire, dont les caractéristiques seraient une non-pigmentation des colonies, un défaut de synthèse de thymidine,

une réduction de production d'alpha-toxine (Von Eiff, Peters, and Becker, 2006). La prévalence des SCVs n'est pas aisée à estimer en raison de la difficulté de son identification, et éventuellement par des conditions de cultures non adaptées en laboratoire conventionnel, qui pourraient être à l'origine d'une sous estimation de ce variant. Cette problématique a néanmoins été abordée par plusieurs équipes, dont une étude germanique portant sur 252 patients ayant relevé une prévalence de 17% parmi les porteurs de *S. aureus* (Besier et al., 2007), vérifiée par un taux de 16,2% par Yagci S. et al. (Yagci et al., 2011). Son impact clinique associerait un haut niveau de résistance aux antibiotiques et un état avancé dans la pathologie respiratoire (Besier et al., 2007). Le phénotype de SCV de *S. aureus* aurait de plus une tendance à une plus longue persistance que le phénotype normal (Kahl et al., 2003). D'autre part, ce caractère adaptatif aurait pour conséquence une relative résistance aux antibiotiques, comme les aminosides ou le triméthoprim-sulfaméthoxazole, et serait sélectionné par une exposition à ces mêmes molécules (Schneider et al., 2008). Le caractère hypermutateur est quant à lui reconnu comme un marqueur d'adaptation chez d'autres bactéries. Chez *S. aureus*, il joue un rôle central dans l'acquisition de résistances aux antibiotiques. Dans la majorité des cas, les mutations concernent les gènes *mutS* et *mutL*, impliqués dans la réparation des mésappariements (Prunier et al., 2003).

f) Antibiothérapie

L'acquisition de résistances aux antibiotiques par *S. aureus* est un enjeu majeur dans la prise en charge adaptée du patient atteint de mucoviscidose. Les recommandations diffèrent entre les pays, mais le manque d'études concluantes sur le sujet ne permet pas de conseiller une directive unique dans ce domaine complexe.

La conférence de consensus de Novembre 2002 a tenté d'orienter la prise en charge de la pathologie respiratoire des patients atteints de mucoviscidose en France, dont le traitement de *S. aureus* (Société Française de Pédiatrie and ANAES, 2002b). Les principaux antibiotiques anti-staphylococciques utilisés dans la mucoviscidose sont présentés dans les **tableaux 4 et 5**.

Tableau 4 Principaux antibiotiques anti-staphylococciques utilisés per os (Société Française de Pédiatrie and ANAES, 2002b).

Nom (par ordre alphabétique)	Posologie proposée en mg/kg par jour	Nombre de prises par jour	Conformité à l'AMM*
Acide fusidique en association (cf. texte)	30 à 60 (E)** Maxi 1 500 mg/j 1 000 à 1 500 mg/j (A)	2 à 3	=
Amoxicilline + acide clavulanique	80 (E) Maxi 3 000 mg/j (E) (A)	2 à 3	=
Céfalexine	50 (E) 100 (A)	3	≧
Ciprofloxacine	30 (E) Maxi 1 500 mg/j (E) (A)	2 à 3	=
Erythromycine	50 (E) Maxi 3 000 mg/j (E) (A)	2	=
Linézolide (AMM si âge > 18 ans)	1 200 mg/j	2	=
Minocycline	4 (si âge > 8 ans) 100 à 200 mg/j (A)	2	=
Oxacilline, cloxacilline	100 à 150	3 à 4	≧
Pristinamycine	50 (E) (A) Maxi 4 000 mg/j	2	=
Rifampicine en association (cf. texte)	20 à 30 Maxi 20 (A)	2	=

* AMM : autorisation de mise sur le marché ; = : posologie conforme à celle de l'AMM ; > : posologie supérieure à celle de l'AMM.

** (A) : chez l'adulte ; (E) : chez l'enfant.

Tableau 5 Principaux antibiotiques anti-staphylococciques utilisés par voie IV (Société Française de Pédiatrie and ANAES, 2002b).

Nom (par ordre alphabétique)	Posologie proposée en mg/kg par jour	Nombre d'injections par jour	Conformité à l'AMM
Amikacine	20 à 30 maxi 20 mg/kg/j (A) Dose totale cumulée < 15g	1 à 3	>
Amoxicilline + acide clavulanique	200 (E) 2 à 12 g/j (A) Maxi 1 200 mg acide clav /j et 200 mg/injection (A)	3 à 4	=
Ciprofloxacine	30 (E) 400 à 1 200 mg/j (A) Maxi 1 200 mg/j (E) (A)	2 à 3	=
Linézolide (AMM si âge > 18 ans)	1 200 mg/j (> 18 ans)	2	=
Oxacilline	300	3 à 4	≧
Rifampicine	20 à 30 Maxi 20 (A)	2	=
Teicoplanine	20	1 à 2	≧
Tobramycine	8 à 10	1 à 3	≧
Vancomycine	40 (E) 2 000 mg/j (A)	4	=

SAMS. La prophylaxie primaire du SAMS n'est pas recommandée en raison d'un risque de colonisation à *P. aeruginosa* plus fréquente et plus précoce (Smyth and Walter, 2010). Cette ligne directive est suivie également aux Etats-Unis (Goss and Muhlebach, 2011), ainsi que par le consensus européen (Doring and Hoiby, 2004). En revanche, le rapport du groupe britannique de la Cystic Fibrosis Trust de mai 2009 recommande l'utilisation d'un antibiotique à spectre étroit, la flucloxacilline, pour réduire l'incidence de la colonisation à SAMS (UK Cystic Fibrosis Trust Antibiotic Working Group, 2009), et ce, dès le diagnostic de mucoviscidose et jusqu'à l'âge de trois ans. La plupart des groupes de travail sur le sujet restent opposés à cette méthode, car la réduction de la colonisation à *S. aureus* n'est pas recevable au prix du risque d'une acquisition précoce et accrue de ce pathogène, actuellement bien reconnu dans la mucoviscidose, qu'est le bacille pyocyanique.

Le traitement des exacerbations à SAMS est quant à lui recommandé, bien qu'une absence d'étude concluante sur le sujet ne puisse confirmer la nécessité de traiter. La monothérapie par voie orale est à privilégier, par une bêta-lactamine, telle que l'oxacilline ou la cloxacilline, pouvant être associée à l'acide fusidique. La durée de traitement est d'au moins 14 jours, avec une prolongation possible de 1 à 3 mois en fonction de la clinique associée.

En ce qui concerne l'antibioprophylaxie secondaire du SAMS, une monothérapie par oxacilline, cloxacilline ou minocycline peut être introduite, en traitement d'entretien, afin d'éviter les exacerbations. Le linézolide pourrait également être utilisé.

Le terme d'éradication est proposé par le groupe de travail européen sur le traitement des infections. Il consiste en l'administration d'une bithérapie (dicloxacilline et acide fusidique ou dicloxacilline et clindamycine) pendant 2 à 4 semaines, voire 1 à 3 mois si le traitement échoue. Les antibiotiques anti-staphylococciques proposés sont répertoriés dans le **tableau 6**. Enfin, les recommandations britanniques conseillent l'administration de flucloxacilline, associée éventuellement à l'acide fusidique ou à la rifampicine, voire l'introduction d'antibiotiques par voie parentérale. Les céphalosporines à large spectre ainsi que les macrolides sont déconseillés.

Tableau 6 Antibiotiques anti-staphylococciques recommandés dans la mucoviscidose (Doring and Hoiby, 2004).

Antibiotic	Route of administration	Dose (mg/kg/day)	Number of daily administrations
Flucloxacillin	oral	100	3
Dicloxacillin	oral, i.v.	50	3–4
Fusidic acid	oral, i.v.	25–50	2–3
Clindamycin	oral, i.v.	20–40	2–4
Rifampicin	oral, i.v.	15	2
Vancomycin	i.v.	40	2
Teicoplanin	i.v.	10	1
Linezolid	oral, i.v. (<5 years)	10	3
Linezolid	oral, i.v. (>5 years)	20	2
Moxifloxacin	oral, i.v. (adults)	5–10	1

SAMR. Il n'existe pas à l'heure actuelle d'études démontrant l'intérêt de l'instauration d'un traitement agressif dès la primo-infection à SAMR pour prévenir l'infection chronique. Un traitement oral prolongé par la bithérapie rifampicine et acide fusidique pendant 6 mois peut-être introduit, avec comme alternative, le linézolide, sans qu'il y ait à nouveau d'études contrôlées sur ce type de prophylaxie secondaire. Le groupe européen ajoute la possibilité de l'association rifampicine et clindamycine, et cite le linézolide, à utiliser en association. Aux Etats Unis, outre l'association rifampicine-acide fusidique, la minocycline peut être utilisée chez l'enfant de plus de 8 ans, ainsi que le sulfaméthoxazole - triméthoprimé à tout âge. Le linézolide est également une alternative chez les patients réfractaires à ces premières possibilités, mais les paramètres pharmacocinétiques particuliers des patients atteints de mucoviscidose, d'autant plus marqués chez les enfants vis-à-vis de cet antibiotique, nécessiterait un dosage de celui-ci (Santos et al., 2009). Les autres raisons de n'utiliser le linézolide qu'en dernier recours sont la survenue d'effets indésirables parfois graves (hématologiques) ou irréversibles (toxicité neurologique) lors de traitement au long cours (Ager and Gould, 2012) et l'émergence de résistance (Endimiani et al., 2011). Enfin, les recommandations françaises déconseillent fortement les nébulisations de vancomycine afin d'éviter l'émergence de souches de staphylocoques et également d'entérocoques résistants à cet antibiotique.

Le traitement des exacerbations comprend une bithérapie associant la pristinaamycine et la rifampicine en première intention. Les glycopeptides (vancomycine et teicoplanine) sont une alternative, incluant leurs dosages sériques. La Cystic Fibrosis Trust britannique les recommande en première intention. Le linézolide trouve également sa place dans cette situation, chez les patients âgés de plus de 18 ans, et pour une durée de traitement maximale de 24 jours.

L'éradication du SAMR est préconisée par le groupe britannique, et inclut un traitement topique, comme la mupirocine, avec l'association rifampicine - acide fusidique ou la nébulisation de vancomycine, ou encore une association des trois types de traitement (UK Cystic Fibrosis Trust Antibiotic Working Group, 2009). La Cystic Fibrosis Foundation aux Etats Unis a quant à elle débuté une étude pour évaluer l'efficacité et l'innocuité d'un protocole d'éradication du SAMR par rifampicine, triméthoprimé - sulfaméthoxazole, mupirocine nasale, aseptie par chlorhexidine et désinfection des surfaces (Goss and Muhlebach, 2011).

Enfin, en plus des difficultés liées aux traitements, l'acquisition d'un SAMR a un impact psychologique négatif pour le patient, contraint à des mesures d'hygiène et d'isolement strictes en cas d'hospitalisation.

Ainsi, le traitement du *S. aureus* se heurte à un manque d'études concluantes sur le rôle pathogène de la bactérie dans la composante respiratoire de la mucoviscidose et sur l'efficacité des traitements et leur innocuité, d'autant plus importantes en raison de la fréquence des traitements de longue durée dans cette pathologie.

3. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est la bactérie dont le rôle dans la pathologie respiratoire de la mucoviscidose est le mieux reconnu. Son identification dans les prélèvements respiratoires des patients atteints de mucoviscidose signe un tournant dans la maladie. Ce germe ne faisant que très rarement partie de la flore oro-pharyngée, sa présence dans les prélèvements de type expectorations, aspirations pharyngées ou écouvillonnages pharyngés constitue un tournant évolutif péjoratif de la mucoviscidose, souvent inéluctable, avec pratiquement 95% des patients infectés par le germe en phase terminale. En effet, l'incidence augmente avec l'âge, passant de 11% jusqu'à l'âge de 5 ans, à 74% entre 25 et 34 ans (Mayaud, 2007).

Après une primocolonisation, une éradication peut être tentée pour éviter le passage à la chronicité. Cependant, il est possible que le pathogène persiste et constitue une colonisation chronique, où l'élimination radicale de la bactérie devient alors illusoire. Cette démarche d'éradication est justifiée par la propension de *P. aeruginosa* à causer des infections chroniques. En effet, sa capacité à développer des stratégies pour résister aux assauts du système immunitaire de son hôte, ainsi qu'aux cures antibiotiques prolongées lui permettent de persister dans les poumons des patients (Hauser et al., 2011). Une des adaptations largement étudiée et reconnue est la formation d'exopolysaccharides, notamment d'alginate (Pedersen et al., 1992). La bactérie est alors dite « mucoïde ». Ce phénomène réalise un biofilm ou « slime » qui participe à la viscosité du mucus bronchique, favorise l'adhésion de la bactérie, et forme une véritable barrière aux défenses immunitaires de l'hôte et à la pénétration des antibiotiques (Lenoir et al., 2007).

L'infection bronchopulmonaire à *P. aeruginosa* est définie sur des critères cliniques et microbiologiques (Société Française de Pédiatrie and ANAES, 2002b). La recherche de signes cliniques d'exacerbation, non spécifiques à *P. aeruginosa* est indispensable au diagnostic d'infection. La primocolonisation à *P. aeruginosa* peut advenir très tôt dans l'enfance et est objectivée dès la première identification de la bactérie dans les prélèvements respiratoires. Cette identification peut être uniquement sérologique, par la présence d'anticorps anti-pyocyaniques en l'absence de prélèvements bactériologiques non invasifs positifs. Une colonisation intermittente s'ensuit, avec des souches différentes, avant l'installation d'une souche unique, d'abord non mucoïde et relativement sensible aux antibiotiques (Mariani-Kurkdjian and Bingen, 2003). La mise en œuvre d'un protocole d'éradication précoce et intensif de la bactérie est alors recommandée. Il s'agit d'une bithérapie de 2 antibiotiques bactéricides administrés par voie IV pendant 14 à 21 jours (une β -lactamine et un aminoside), possiblement suivis d'aérosols de colimycine pendant 3 à 6 mois. La ceftazidime et la tobramycine sont classiquement utilisés. Le contrôle de l'efficacité de cette cure est effectué par des ECBC mensuels. Une nouvelle cure IV est préconisée en cas d'échec d'éradication de la bactérie. L'identification de la bactérie dans 3 examens bactériologiques sur 6 mois à au moins 1 mois d'intervalle définit la chronicité de la colonisation d'une part, s'il n'existe pas de signes cliniques

associés ou si la sérologie est négative (moins de 2 arcs de précipitines anti-pyocyaniques), et de l'infection d'autre part, en présence de signes cliniques d'infection ou d'une sérologie positive. Dans un prélèvement protégé comme le LBA, un seuil de 10^5 UFC/ml pourrait différencier une colonisation d'une infection chronique (Société Française de Pédiatrie and ANAES, 2002b) (David, 2003). L'infection chronique doit également faire l'objet d'une prise en charge thérapeutique, afin de diminuer l'inoculum bactérien, d'espacer les exacerbations et de ralentir la dégradation de la fonction pulmonaire. Le traitement des exacerbations repose sur une bithérapie associant une β -lactamine et la tobramycine par voie parentérale pendant au moins 14 jours. Le développement de souches multirésistantes, sélectionnées au fil du temps par les multiples traitements antibiotiques, requiert l'ajout de la ciprofloxacine *per os* à cette bithérapie. La colistine par voie IV peut être une alternative possible dans cette situation. Le traitement de l'infection chronique peut comprendre des cures IV tous les 3 mois ou seulement lors des épisodes d'exacerbation. Un traitement d'entretien par des antibiotiques inhalés peut être entrepris, avec le choix de la tobramycine par cure de 28 jours, espacées du même laps de temps sans traitement. La ciprofloxacine trouve également une place dans ces propositions thérapeutiques, notamment lorsque les cures sont de plus en plus fréquentes, ainsi que les macrolides, dont l'azithromycine (Société Française de Pédiatrie and ANAES, 2002b).

L'efficacité des cures antibiotiques est essentiellement évaluée sur l'amélioration clinique, plus que sur les résultats bactériologiques. Les traitements sont autant que possible réalisés à domicile, afin d'améliorer le confort des patients déjà polymédicamentés. Le capital veineux est également largement sollicité et nécessite d'être préservé, et peut amener à mettre en place des dispositifs à chambre implantable.

P. aeruginosa reste à ce jour le pathogène majeur, responsable du pronostic des patients atteints de mucoviscidose, mais sa prise en charge a été largement optimisée, et est probablement à l'origine d'une régression du pourcentage de patients infectés par le bacille pyocyanique, passé de 44,5% en 2001 à 42,9% en 2010 des patients suivis dans les CRCM en France (Vaincre la Mucoviscidose and Ined, 2010b).

4. *Stenotrophomonas maltophilia*

Stenotrophomonas maltophilia est un bacille gram négatif, que l'on retrouve dans 8,5% des ECBC des patients suivis dans les CRCM en France, au cours de l'année 2010 (Vaincre la Mucoviscidose and Ined, 2010b). Sa fréquence d'isolement est en hausse (5,9% en 2001 en France), probablement en rapport avec une meilleure identification et prise en compte du germe dans les laboratoires. Le réservoir naturel de cette bactérie est environnemental, notamment le sol et l'eau. *S. maltophilia* est un germe fréquemment impliqué dans les infections nosocomiales. Ce bacille est naturellement résistant à de nombreux antibiotiques, dont les carbapénèmes (Looney, Narita, and Muhlemann, 2009). L'exposition prolongée à des antibiotiques à larges spectres favoriserait l'acquisition de la bactérie (Talmaciu et al., 2000). Le rôle pathogène de *S.maltophilia* n'est pas

confirmé chez les patients atteints de mucoviscidose, certaines études ne montrant pas d'impact délétère sur la fonction respiratoire des patients porteurs de la bactérie (Waters et al., 2012). Une hypothèse serait que *S. maltophilia* serait plutôt un marqueur d'une détérioration avancée de la fonction respiratoire (De Vrankrijker, Wolfs, and van der Ent, 2010). Les multiples résistances intrinsèques de cette bactérie compliquent de plus, le choix d'antibiotiques. Le cotrimoxazole est le traitement le plus approprié, mais la résistance à cette molécule commence à émerger (Looney, Narita, and Muhlemann, 2009). Une alternative fréquemment efficace est l'utilisation de la ticarcilline-acide clavulanique.

5. *Achromobacter xylosoxidans*

Ce bacille gram négatif d'origine aquatique est un pathogène opportuniste, capable d'infecter des sujets immunodéprimés. Sa véritable fréquence d'isolement dans les prélèvements des patients atteints de mucoviscidose est incertaine, en raison de difficultés d'identification, dues, entre autres, de confusions de nomenclature. *Achromobacter xylosoxidans*, ancien *Alcaligenes xylosoxidans*, est présent chez 4,4% des patients suivis dans les CRCM en 2010 (Société Française de Pédiatrie and ANAES, 2002b). Sa responsabilité dans la pathologie respiratoire de la mucoviscidose est mal connue, les études sur le sujet étant contradictoires (Hauser et al., 2011). L'infection est plus fréquemment transitoire, alors que seulement 2% des patients seraient infectés de façon chronique (Tan et al., 2002). Cette bactérie est naturellement résistante à plusieurs classes d'antibiotiques, dont les β -lactamines, par production d'une céphalosporinase chromosomique, les aminosides et les fluoroquinolones. Aucune véritable standardisation sur le traitement de l'infection à *Achromobacter xylosoxidans* n'étant disponible, les associations d'antibiotiques semblent les plus appropriées (Saiman et al., 2001).

6. Complexe *Burkholderia cepacia*

Le complexe *Burkholderia cepacia* regroupe des bactéries à gram négatif, dont le réservoir naturel est environnemental. Depuis les années 80, il est devenu un problème sérieux dans de nombreux centres de patients atteints de mucoviscidose. Les aspects cliniques de l'infection sont très variables, allant d'un simple portage à des tableaux beaucoup plus sévères, voire au décès (Mariani-Kurkdjian and Bingen, 2003). Le complexe *Burkholderia cepacia*, ou *Burkholderia cepacia* « *sensu lato* », regroupe neuf espèces (anciens *genovars* I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII et IX). Les deux espèces majeures isolées dans la mucoviscidose sont *B.cenocepacia* et *B.multivorans* (Meghdas et al., 2004; Segonds, Monteil, and Chabanon, 2006). *B.cenocepacia* est une espèce particulièrement préoccupante, car responsable du « syndrome cepacia », correspondant à une pneumonie nécrosante associée à une septicémie rapidement mortelle. Elle est également responsable d'un risque de mortalité plus élevé à la suite d'une transplantation pulmonaire chez les patients préalablement infectés par la bactérie (Aris et al., 2001; LiPuma, 2001). Le traitement des infections aux bactéries du complexe *B.cepacia* relève d'une grande difficulté au regard de leurs nombreuses résistances naturelles aux antibiotiques, ainsi

que du développement fréquent de résistances supplémentaires en cours de traitement. L'association d'antibiotique est recommandée, comme la trithérapie ceftazidime, méropénème et tobramycine qui semble plus efficace (Segonds, Monteil, and Chabanon, 2006).

7. Mycobactéries non tuberculeuses

Les patients atteints de mucoviscidose représentent un groupe à risque d'infections à mycobactéries atypiques ou non tuberculeuses (MNT). La fréquence d'isolement des MNT dans les prélèvements respiratoires avoisine les 10-15% des patients. Les deux principales espèces isolées dans la mucoviscidose sont les mycobactéries du complexe *abscessus-chelonae*, prédominantes en Europe, et celles du complexe *avium-intracellulare*, prédominantes dans les études nord-américaines (Le Bourgeois et al., 2005). *M. abscessus* n'est pas seulement le pathogène le plus fréquemment retrouvé en Europe, mais est aussi la seule mycobactérie à croissance rapide à être un pathogène respiratoire significatif, capable de causer une véritable maladie mycobactérienne d'allure pseudotuberculeuse, ainsi qu'une évolution péjorative après transplantation (Roux et al., 2010). De plus, elle est capable d'infecter les patients dès leur première année de vie, au contraire de *M. avium-intracellulare*. Enfin, *M. abscessus* est une mycobactérie particulièrement résistante aux antibiotiques. Le traitement est fondé sur l'association d'un macrolide à un ou plusieurs autres antibiotiques, comme la céfoxitine, la tigécycline, l'imipénème ou l'amikacine, en fonction du profil de résistance de la mycobactérie (Coolen-Allou and Burgel, 2012).

B. Infections fongiques

La colonisation fongique est fréquente chez les patients atteints de mucoviscidose. L'espèce la plus fréquente est *Aspergillus fumigatus*, mais d'autres espèces filamenteuses telles que *Scedosporium apiospermum* et *Geosmithia argilacea*, ainsi que des levures, dont *Candida albicans* majoritairement, peuvent être retrouvées dans les prélèvements. Les infections sont essentiellement liées à *Aspergillus fumigatus*, et sont dominées par l'aspergillose bronchopulmonaire allergique (ABPA). Son traitement repose sur les corticoïdes, qui ciblent la réponse inflammatoire, et les antifongiques qui permettent de limiter la prolifération d'*A. fumigatus* et la charge antigénique (Le Bourgeois et al., 2011).

C. Infections virales

Comme dans la population générale, les patients atteints de mucoviscidose sont susceptibles de subir des infections virales. Les virus les plus communément impliqués au niveau respiratoire, sont les influenza virus, parainfluenza virus, adenovirus, respiratory syncytial virus et les rhinovirus. Les infections virales pourraient contribuer aux exacerbations dans la mucoviscidose, mais, même si certaines études relatent leur impact sur la détérioration de la fonction pulmonaire (Van Ewijk et al., 2005), elles ne permettent pas de conclure sur leur véritable rôle dans la pathogénicité respiratoire (Hauser et al., 2011).

III. Méthodes d'identification et de typage de *Staphylococcus aureus*

A. Identification phénotypique de *S. aureus*

La technique de prise en charge des prélèvements broncho-pulmonaires au laboratoire du CHU de Rouen utilise la méthode particulière de l'« antibiogramme direct ». Cette méthode permet de récupérer les différents phénotypes éventuels d'une même espèce bactérienne.

Dans le cas de *S. aureus*, une colonie de SAMS est théoriquement indiscernable morphologiquement d'une colonie de SAMR. Le recueil d'un ensemble de colonies de *S. aureus* dans le diamètre d'un antibiotique stratégique permet d'augmenter la probabilité d'obtenir tous les phénotypes, voire les génotypes de *S. aureus* présents dans le prélèvement, et d'en faire l'antibiogramme, reflet des résistances possibles de la population globale de *S. aureus* du patient (Figure 12).

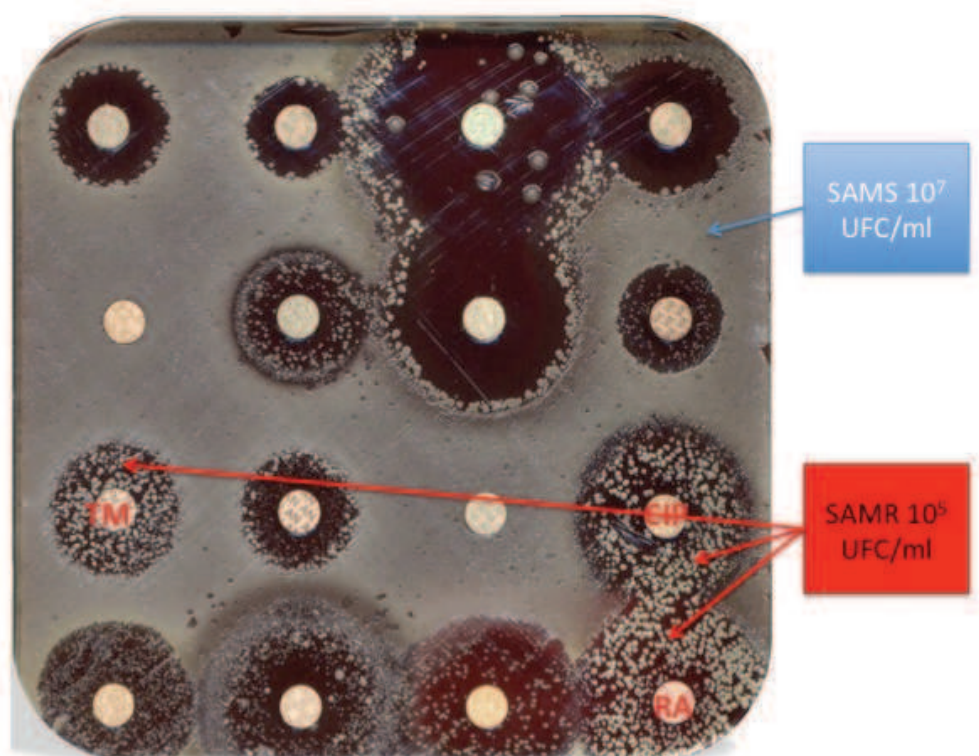


Figure 12 Exemple de détection des bactéries dans un prélèvement broncho-pulmonaire sur une gélose au sang sur laquelle sont apposés des disques d'antibiotiques. Sur cet exemple, le SAMS est majoritaire (10^7 UFC/ml), mais on peut noter la présence d'un autre *S. aureus* (10^5 UFC/ml) dont les résistances supplémentaires le distingue du SAMS, entre autres, autour des disques de ciprofloxacine (CIP), tobramycine (TM) et rifampicine (RA), qui s'est avéré être un SAMR.

S. aureus est un cocci gram positif, immobile, non sporulé, se groupant par paire, tétrades ou « grappes de raisin ». Sa croissance ne nécessite pas d'exigences nutritionnelles particulières, et peut se faire en aérobiose ou anaérobiose, à 37°C. Il peut se multiplier sur des milieux riches en NaCl. *S. aureus* produit un pigment jaune-doré, le différenciant des staphylocoques dits « blancs » ou staphylocoques à coagulase négative (SCN). Ses caractéristiques biochimiques principales sont les suivantes : catalase positive, production d'une coagulase (qui le différencie des SCN), fermentation de divers sucres, notamment le mannitol, au contraire des SCN.

S. aureus possède en outre divers facteurs de virulence, dont la production de diverses substances diffusibles, expliquant en partie le pouvoir pathogène de cette bactérie : hémolysine, entérotoxines, toxine TSST (toxic-shock syndrom toxin), leucocidine de Pantan-Valentine, lipases... Parmi les antigènes capsulaires ou pariétaux présents chez la bactérie, qui permettent le sérotypage des souches, une protéine de paroi, la protéine A, a la propriété de fixer les immunoglobulines de classe G par leur fragment Fc et d'inhiber l'opsonophagocytose. Elle joue également le rôle d'adhésine lors d'infections intra-vasculaires. Elle est également utilisée pour typer les souches de *S. aureus* (Freney et al., 2000).

L'identification de *S. aureus* est suivie de la réalisation d'un antibiogramme. La sensibilité des souches sauvages de *S. aureus* aux β -lactamines est variable selon les molécules. Actuellement, 80% des souches de *S. aureus* produisent une pénicillinase, les rendant résistantes à la pénicilline G et à l'ampicilline. L'oxacilline et la cloxacilline, sont les β -lactamines de référence sur les souches sauvages, qui n'ont pas de résistances acquises. Les deux mécanismes principaux de résistance aux β -lactamines sont la production de pénicillinase, et la méthicillino-résistance par modification de la cible de ces antibiotiques. Cette dernière est due à la production d'une PLP (protéine liant les pénicillines) additionnelle, la PLP2a, codée par un gène inductible, *mecA*. Ce gène est intégré à un élément génétique mobile, la cassette chromosomique SCC*mec*. Cette résistance peut être détectée phénotypiquement par un disque de moxalactam, oxacilline ou cefoxitine, ou par biologie moléculaire (recherche du gène *mecA*). La résistance à la méticilline est croisée entre toutes les β -lactamines (Courvalin, Leclerc, and Bingen, 2006; Daurel and Leclerc, 2008). Les souches « borderline » ou BORSA (borderline oxacillin resistant *S. aureus*), caractérisées par une activité diminuée à l'oxacilline par hyperproduction de pénicillinase, en l'absence de gène *mecA* sont décrites dans la mucoviscidose, et pourraient être la conséquence d'une pression de sélection par antibiothérapie chez des patients infectés de façon chronique à SAMS (Leahy et al., 2011).

La résistance aux aminosides est principalement due à des enzymes inactivatrices. Trois enzymes sont décrites chez *S. aureus*, qui donnent les phénotypes de résistances K (résistances à la kanamycine et à l'amikacine), KT (résistances à la kanamycine, l'amikacine et à la tobramycine) et KTG (résistances à la kanamycine, l'amikacine, la tobramycine, la gentamycine et à la nétilmycine). Ces enzymes sont fréquemment retrouvées chez le SAMR, tout comme la résistance aux quinolones.

S. aureus est naturellement résistant aux quinolones de première génération (acide nalidixique), mais est sensible aux fluoroquinolones systémiques (ciprofloxacine, ofloxacine, lévofloxacine, moxifloxacine et péfloxacine) ou urinaires (norfloxacine). Le principal mécanisme de résistance aux quinolones est la mutation de la ou les cibles de l'antibiotique (gyrase et topoisomérases IV). Ces mutations ponctuelles vont conférer une résistance par palier. Un haut niveau de résistance aura pour conséquence une résistance croisée aux fluoroquinolones.

Plusieurs mécanismes de résistance aux macrolides – lincosamides - streptogramines (MLS) sont décrits chez *S. aureus*. Le plus fréquent est le phénotype MLS_B (constitutif ou inductible), qui survient chez *S. aureus* par modification de la cible de l'antibiotique (méthylation ribosomale). Il peut également s'agir d'un mécanisme d'efflux (phénotype MSB), qui épargne la pristinaamycine, d'une inactivation des lincosamides (phénotype L), du phénotype LSA qui touche les lincosamides et les streptogramines A, ou encore de la résistance à la pristinaamycine de façon isolée.

La résistance au cotrimoxazole (association sulfamide - triméthoprim) est due à une modification de la cible, touchant soit les sulfamides, soit le triméthoprim. Elle est peu fréquente chez *S. aureus*, au contraire des staphylocoques à coagulase négative.

S. aureus est naturellement sensible à la rifampicine et à l'acide fusidique, mais des résistances acquises peuvent survenir, notamment chez les SAMR.

La résistance aux glycopeptides (vancomycine et teicoplanine) est actuellement rare en France, mais des souches de *S. aureus* de sensibilité diminuée aux glycopeptides ont été décrites depuis plusieurs années. En France, ce type de résistance concerne presque exclusivement les souches simultanément résistantes à la méticilline et à la gentamicine (Bonnet R. et al., 2012), et regroupe les souches appelées VISA (vancomycin intermediate *S. aureus*), GISA (glycopeptide intermediate *S. aureus*) et hétéro-VISA (souches sensibles à la vancomycine, mais présentant une sous-population intermédiaire à l'antibiotique). Ce type de résistance est rarement décrit dans la mucoviscidose, mais pourrait commencer à émerger (Filleron et al., 2011).

Le linézolide, seul représentant de la famille des oxazolidinones, est très actif sur *S. aureus*, incluant les SAMR (Betton et al., 2006; Dutronc et al., 2005). Même si la résistance à cet antibiotique est rare chez *S. aureus*, l'utilisation prolongée du linézolide dans les infections chroniques, telles que les infections broncho-pulmonaires dans la mucoviscidose, peut être à l'origine de résistances (Endimiani et al., 2011). Deux mécanismes de résistance sont rapportés. Le plus commun est une mutation au sein du domaine V du gène de l'ARN ribosomal 23S. *S. aureus* possédant plusieurs copies de ce gène, le niveau de résistance est fonction du nombre de copies mutées. Un second mécanisme consiste en la méthylation de l'ARN 23S.

Les méthodes phénotypiques ne permettent pas toutefois d'affirmer la parenté des souches entre elles, deux souches génotypiquement différentes pouvant exprimer les mêmes phénotypes de résistance. Les méthodes de biologie moléculaire sont alors indispensables aux études

épidémiologiques et à la comparaison de souches entre elles, lors d'infections chroniques telles que la mucoviscidose.

B. Méthodes de typage de *S. aureus*

Dans de nombreux domaines, une surveillance épidémiologique est nécessaire. La surveillance des épidémies et le suivi des infections nosocomiales sont des préoccupations de santé publique qui ont incité à développer des méthodes de génotypage des souches bactériennes. Ces méthodes sont aussi utilisées pour permettre une meilleure compréhension des dynamiques de colonisations bactériennes chroniques, comme dans la mucoviscidose.

En ce qui concerne plus précisément la colonisation à *S. aureus* dans la mucoviscidose, différentes techniques sont utilisées, initialement développées pour le suivi des SAMR. Ces techniques comprennent l'électrophorèse en champ pulsé (pulsed-field gel electrophoresis ou PFGE), le séquençage de 7 gènes de ménage (multilocus sequence typing ou MLST), le séquençage du gène de la protéine A (*spa* typing), le typage des répétitions en tandem polymorphes (multi locus VNRT analysis ou MLVA) et le typage de la cassette *SCCmec*, uniquement présente chez les SAMR. Ces méthodes, même si elles présentent toutes un bon pouvoir discriminant, sont complémentaires, permettant ainsi d'apporter chacune leurs propres qualités spécifiques, et d'affiner les études épidémiologiques.

1. PFGE

PFGE est considérée comme la méthode de référence dans le typage des souches de SAMR, grâce à son fort pouvoir discriminant, rendant cette technique particulièrement utile pour étudier les épidémies ou les transmissions entre patients ou hôpitaux (Bannerman et al., 1995; Finney, 2001; Tenover et al., 2009). Le typage du SAMR par PFGE consiste en la digestion d'ADN chromosomique purifié par une enzyme restrictive, *SmaI*, suivie d'une électrophorèse en gel d'agarose. Les profils obtenus sont comparés entre eux, selon les critères proposés par Tenover et al. (Tenover et al., 1995). Les inconvénients de cette technique sont son coût, son accessibilité variable selon les équipements des laboratoires, et surtout sa faible reproductibilité inter-laboratoires. Son intérêt reste ainsi limité à des études de micro-épidémiologie, sur des souches isolées dans un espace spatio-temporel étroit (Reverdy M.-E et al., 2005).

2. MLST

La MLST est une méthode à fort pouvoir discriminant pour caractériser des souches bactériennes, fondée sur le séquençage de 7 gènes de ménage d'environ 500 pb : *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* et *yqiL* (Deurenberg and Stobberingh, 2008; Maiden et al., 1998). Les séquences sont ensuite analysées dans une base de données accessible par internet, pour attribuer un type de séquence (sequence type ou ST) à chaque souche analysée. Tous les ST ayant 5 des 7 gènes en commun sont

regroupés dans un même complexe clonal (CC). L'algorithme BURST (Based Upon Related Sequence Type) compile les données MLST et identifie les « single locus variants » (SLVs) parmi tous les STs. Le ST fondateur est défini comme celui possédant le plus grand nombre de SLVs. A partir de ce clone fondateur, se greffent des STs qui diffèrent par un seul locus (SLV) ou éventuellement par deux locus (DLV). Cette méthode est utilisée pour *S. aureus* (Enright et al., 2000), et est un excellent outil pour étudier l'évolution des SAMR et leur phylogénie (Deurenberg et al., 2007). Cette méthode standardisée possède une excellente reproductibilité inter- et intra-laboratoires, ce qui en fait un outil de choix dans les suivis des clones de SAMR, à l'échelle mondiale. Ses inconvénients sont essentiellement son coût, son accessibilité et sa nécessité d'être remise constamment à jour, en fonction des nouveaux STs trouvés.

3. *Spa* typing

La caractérisation du nombre et de la structure des répétitions présentes dans la séquence codante du gène de la protéine A de *S. aureus* est une autre technique de typage des souches. Cette méthode, développée par Frenay et al. en 1996 (Frenay et al., 1996), détermine les variations dans la séquence de la région polymorphe X du gène *spa*.

Ce gène comporte deux régions, nommées Fc-binding region et X-region (**Figure 13**). La région X est caractérisée par la présence de courtes séquences répétées, au nombre de 3 à 15, de 24 pb le plus souvent, mais pouvant comporter 21 à 30 nucléotides. Cette région est hautement polymorphe. Des délétions ou des duplications de ces séquences répétées peuvent être observées, ainsi que des mutations ponctuelles.

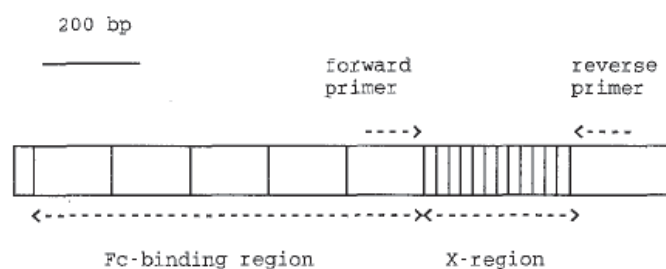


Figure 13 Représentation du gène *spa* codant pour la protéine A par Frenay et al., 1996. Ce gène comporte une région capable de fixer le fragment Fc des immunoglobulines (Fc-binding region) et une région appelée X, composée d'un nombre variable de séquences répétées.

Ce polymorphisme est dû à une variation dans le nombre de répétitions et/ou à une variation au sein même d'une répétition par mutagenèse. Actuellement, 549 types de répétitions ont été identifiés.

De part l'identification et l'agencement de ces répétitions, un type de gène *spa* (*spa* type) en est déduit. La base de donnée RidomStaphType (<http://www.spaserver.ridom.de/>), gérée par Ridom Bioinformatics a répertorié près de 10800 *spa* types, et commercialise un logiciel capable d'analyser les séquences *spa* obtenues (Harmsen et al., 2003). La nomenclature des *spa* types a été standardisée,

facilitant la reproductibilité interlaboratoires (Aires-de-Sousa et al., 2006). Comme dans le cas de la MLST, un algorithme BURP (Based Upon Repeat Pattern) a été développé afin de regrouper les *spa* types dans différents groupes ou « complexes clonaux », selon leurs liens communs (Strommenger et al., 2008).

Le pouvoir discriminant du séquençage du gène *spa* se situe entre ceux de PFGE et de la MLST (Malachowa et al., 2005). De plus, au contraire de la MLST et de PFGE, le typage du locus *spa* peut être à la fois utilisé d'une part pour étudier les microvariations génétiques (survenant rapidement), importantes dans les analyses des épidémies, et d'autre part, pour étudier les macrovariations génétiques (survenant lentement), utilisées dans les analyses de populations et la phylogénie (Koreen et al., 2004). Une bonne concordance a été observée entre la PFGE, MLST et *spa* typing en combinaison avec l'algorithme BURP (Deurenberg and Stobberingh, 2008; Malachowa et al., 2005; Strommenger et al., 2006). En outre, l'analyse d'un seul locus réduit drastiquement le coût de l'étude investiguée et la consommation de temps technique, par rapport aux autres méthodes.

4. MLVA

Une approche plus récente complète les méthodes de typage décrites précédemment. Les répétitions en tandem polymorphes, base de la technique MLVA, peuvent être des marqueurs génétiques efficaces pour distinguer les souches entre elles (Sabat et al., 2003). Il s'agit de répétitions d'un motif de nucléotides, présentes dans tous les génomes eucaryotes ou procaryotes, situés dans des régions codantes ou non codantes. Un type de polymorphisme, utilisé dans l'approche MLVA, consiste en la variation du nombre de motif, appelée VNRT (variation number of tandem repeats). Le locus *spa* fait partie de ces VNRT. La combinaison des séquences de ceux-ci permet d'établir un arbre phylogénétique. Cette technique a un très fort pouvoir discriminant, est relativement accessible, a une excellente reproductibilité interlaboratoires (Schouls et al., 2009).

5. Cassette SCCmec pour MRSA

La caractérisation de la cassette contenant le gène de résistance à la pénicilline, *mecA* (staphylococcal chromosomal cassette ou SCCmec) est un outil épidémiologique largement utilisé pour étudier les souches de SAMR. La cassette comporte deux éléments essentiels : le complexe du gène *mec* et le complexe du gène codant des recombinaisons *ccr* (cassette chromosome recombinaison), responsables de la mobilité de la cassette. Plusieurs types de structures ont été identifiées, classées du type I à VIII (International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC), 2009). Certains types de cassettes codent pour une résistance aux β -lactamines, tandis que d'autres concernent d'autres classes d'antibiotiques (Goss and Muhlebach, 2011). Le typage de cette cassette complète les données épidémiologiques concernant les SAMR, et est utilisé pour différencier les SAMR d'origine hospitalière (SCCmec I, II ou III) ou d'origine communautaire (SCCmec IV à VIII de plus petite taille).

6. Epidémiologie de *S. aureus* en France

La plupart des études épidémiologiques menées sur *S. aureus* concernent les SAMR, ce qui a pour conséquence une méconnaissance de la diversité des SAMS. Les études dans la mucoviscidose en font également partie. Toutefois, une étude concernant des souches de 10 patients atteints de mucoviscidose, a étudié l'évolution des colonisations à *S. aureus* chez ces patients. Ces souches ont été caractérisées par PFGE et séquençage du gène *spa*. Les auteurs ont retrouvé une globale similitude des *spa* types au niveau individuel, suggérant la présence d'un ancêtre commun, peu à peu modifié par des délétions ou des duplications de séquences répétées, ou des mutations ponctuelles (Kahl et al., 2005). Une précédente étude avait déjà évoqué la présence d'un unique clone, colonisant de façon chronique les patients atteints de mucoviscidose (Kahl et al., 2003). Cette hypothèse a été confirmée par une étude française plus récente, qui a analysé les souches de 79 patients atteints de mucoviscidose (SAMS et SAMR). La méthode MLVA a été utilisée pour caractériser 278 isolats, et parmi ceux-ci, 61 ont été séquencés sur la base du typage du gène *spa*. Il en résulte que, dans la plupart des cas, la colonisation chronique est due à une seule et unique souche fondatrice, qui peut varier au cours du temps par des événements mutationnels (Vu-Thien et al., 2010).

Plus globalement, la distribution de *S. aureus* responsables d'infections invasives à l'échelle européenne a été analysée par *spa* typing et cartographiée par le groupe de travail du laboratoire de référence européen des staphylocoques (Grundmann et al., 2010). Il en ressort une grande diversité des clones et une distribution plutôt de nature régionale prédominant chez les SAMR, au contraire des SAMS. Les principaux *spa* types retrouvés dans les 26 pays européens concernés par l'étude sont les suivants :

- SAMS : t002, t084, t015, t091, t012, t127, t008 ;
- SAMR : t032, t008, t041, t003, t002, t067, t001.

Concernant chaque pays individuellement, les 3 *spa* types les plus fréquents ont également été répertoriés (**Tableau 7**). Les *spa* types les plus fréquemment retrouvés en France sont t002, t008 et t012 pour les SAMS et t008, t777 et t024 pour les SAMR.

Le centre de référence des staphylocoques en France, a en outre publié les caractéristiques épidémiologiques des SAMR responsables d'infections invasives en France, entre 2006 et 2007, en détaillant chaque grand clone (Dauwalder et al., 2008). Les 4 principaux clones retrouvés sont le clone Lyon, le clone Géraldine, les clones Pédiatriques et le clone européen ST80. Les *spa* types associés à ces clones sont détaillés dans le **tableau 8**, où l'on retrouve les *spa* types t008, t002 et t777 déjà évoqués à l'échelle européenne. Deux *spa* types sont communs aux SAMS et aux SAMR : t002 et t008.

D'autre part, en parallèle de l'augmentation des SAMR dans le monde, l'incidence des souches communautaires (SAMR-C) s'est accrue. Ces SAMR-C diffèrent des clones hospitaliers (SAMR-H). Ils contiennent les cassette *SCCmec* IV ou V, portent plus fréquemment la toxine LPV et

seraient plus virulents que leurs équivalents hospitaliers (David and Daum, 2010). Chez les patients atteints de mucoviscidose, les souches hospitalières restent majoritaires de façon générale, mais les SAMR communautaires semblent prédominer chez les patients qui ont nouvellement acquis un SAMR (Cocchi et al., 2011; Glikman et al., 2008).

La question de la voie de transmission reste ouverte. Les transmissions directes entre patients ou indirectes, par l'intermédiaire de séjours dans les unités de soins dédiés à la mucoviscidose, sont toutes deux décrites. Les transmissions de SAMR au sein d'une famille sont possibles, qu'il s'agisse de familles comprenant des membres atteints de mucoviscidose ou non (Goerke et al., 2000). De même, l'acquisition de SAMR lors d'une hospitalisation peut advenir (Givney et al., 1997), et ce risque reste présent, bien qu'en diminution, malgré la mise en place de précautions d'isolement des patient (Campana et al., 2004). Les souches retrouvées chez les patients atteints de mucoviscidose sont parfois reliées aux clones localement endémiques (Kidd, Coulter, and Bell, 2006), suggérant le rôle non négligeable des transmissions au sein d'un établissement de soin. Toutefois, les mesures d'hygiène et les précautions d'isolement instaurées lors des hospitalisations restent le meilleur rempart contre le risque de transmission, chez ces patients plus sensibles à l'acquisition de SAMR (Goerke et al., 2000).

Pour conclure, l'épidémiologie de *S. aureus* chez les patients atteints de mucoviscidose est complexe et encore peu décrite, mais semble indiquer que les colonisations chroniques sont majoritairement dues à un même clone, pouvant diverger par des événements mutationnels. La dynamique d'évolution de la colonisation à *S. aureus* dans la mucoviscidose n'a pas encore été clairement étudiée, ni les caractéristiques de l'acquisition supplémentaire d'un SAMR, chez les patients infectés au long cours par SAMS.

Tableau 7 Principaux *spa* types les plus fréquents en Europe par pays (Grundmann et al., 2010).

Country	MSSA <i>spa</i> Type				MRSA <i>spa</i> Type			
	<i>n</i>	1st (%)	2nd (%)	3rd (%)	<i>n</i>	1st (%)	2nd (%)	3rd (%)
Austria	120	t091 (8.3)	t002 (6.7)	t012 (5.0)	54	t190 (18.5)	t041 (16.7)	t001 (14.8)
Belgium	107	t002 (9.4)	t209 (4.7)	t012, t091, t740 (3.7)	88	t008 (29.6)	t002, t038 (13.7)	t740 (12.5)
Bulgaria	29	t056 (10.3)	t078, t148, t156, t1346 (6.9)	a	25	t030 (36.0)	t037 (16.0)	t010 (12.0)
Croatia	50	t050 (10.0)	t005, t015, t1361 (8.0)	t164 (6.4)	38	t041 (36.8)	t091 (10.5)	t026, t1003 (8.3)
Cyprus	9	t002 (22.2)	a	—	7	t012, t30 (28.6)	a	—
Czech Republic	94	t015, t130 (5.3)	t024, t122, t1081 (4.3)	t056, t156, t491, t1231 (3.2)	51	t003 (66.7)	t032 (13.7)	t002 (7.8)
Denmark	108	t230 (7.4)	t002, t127 (4.6)	t065, t084 (3.7)	4	t024, t037 (50.0)	—	—
Finland	15	t026 (13.3)	a	—	7	b	—	—
France	114	t002 (11.4)	t008 (6.1)	t012 (4.4)	111	t008 (48.6)	t777 (7.2)	t024 (5.4)
Germany	98	t008 (11.2)	t084 (7.1)	t015, t091 (6.1)	82	t032 (35.4)	t003 (28.1)	t001 (8.6)
Greece	20	t267 (15.0)	t012 (10.0)	a	15	t002, t044 (26.7)	t037 (20.0)	a
Hungary	66	t091, t216 (10.6)	t012, t084 (7.60)	t002, t015, t2115 (4.7)	44	t032 (38.6)	t041 (25.0)	t062 (13.6)
Iceland	5	b	—	—	0	—	—	—
Ireland	85	t021 (7.1)	t012 (4.7)	t078, t127, t166, t382, t548 (3.6)	84	t032 (45.2)	t515 (9.5)	t022 (4.8)
Italy	80	t091 (10.04)	t084 (8.8)	t012 (7.5)	67	t041 (34.3)	t008 (28.4)	t001 (13.4)
Latvia	38	t435 (21.1)	t015 (13.2)	t013, t698 (7.9)	5	b	—	—
Malta	3	b	—	—	12	t001, t032 (30.0)	t012 (20.0)	t002, t022 (10.0)
Netherlands	195	t091 (7.7)	t127 (6.2)	t002, t012, t084 (4.2)	9	b	—	—
Norway	55	t065 (9.1)	t084 (9.1)	t002, t015, t095 (3.7)	0	—	—	—
Poland	132	t127 (12.9)	t084 (9.9)	t015 (7.6)	47	t037 (29.81)	t003, t015 (14.9)	t002, t041, t1574 (6.4)
Portugal	48	t008 (8.3)	t002, t645 (6.3)	t021, t127, t148, t148, t179, t189 (4.2)	40	t032 (32.5)	t002 (20.0)	t535, t747, t2357 (7.5)
Romania	25	t021, t284 (12.0)	t005, t008, t450 (8.0)	a	11	t030 (54.6)	t127 (36.4)	t015 (9.1)
Slovenia	48	t091 (20.8)	t015 (10.4)	t005 (8.5)	10	t041 (70.0)	a	—
Spain	113	t002 (12.4)	t012, t067 (8.0)	t015 (4.5)	91	t067 (47.3)	t002 (15.4)	t008 (7.7)
Sweden	195	t015 (9.2)	t084 (8.2)	t012 (5.7)	5	b	—	—
UK	71	t012, t127 (5.6)	t021 (4.2)	nine different types	60	t032 (61.7)	t788, t1516 (3.3)	a

*All remaining *spa* types equally distributed.
 †No ranking, all *spa* types equally distributed.
 doi:10.1371/journal.pmed.1000215.t004

Tableau 8 Caractéristiques des clones de SAMR les plus fréquents en France (Dauwalder et al., 2008).

Characteristic or parameter	Lyon clone	Geraldine Clone	Podiatric clone		European ST50 clone
			"Classical" subtype	"New" subtype	
No. of isolates (%)	77 (69.4)	7 (6.3)	9 (8.1)	8 (7.2)	4 (3.6)
No. of health care-associated isolates (%)	47 (61)	4 (57)	6 (66)	6 (75)	3 (75)
No. of hospitals (out of 23)	22	6	5	5	3
Molecular characteristics					
<i>agr</i> allelic group	1	2	2	2	3
ST	8	5	5	5	80
Clonal complex ST	8	5	5	5	80
<i>spa</i> type	t008 and related	t002 and related	t002 and related	t777	t044
SCCmec type	IV (<i>n</i> = 70) or IV _{vancom} (<i>n</i> = 7)	I _{unclassified}	IV	VI	IV
<i>mec</i> complex	B	A	B	B	B
<i>ccr</i> allotype	AB2 with or without AB4 (<i>n</i> = 5) or C (<i>n</i> = 2)	AB1	AB2	AB4	AB2
Toxin genes					
Always positive		<i>tsi</i> , <i>sec</i> , <i>sed</i> , <i>sel</i> , <i>sem</i> , <i>seo</i> , <i>ser</i> ^a	<i>sem</i> , <i>seo</i>	<i>sed</i> , <i>sem</i> , <i>seo</i> , <i>ser</i>	<i>luk-PV</i> ^a , <i>edn</i>
Always negative	<i>seh</i> , <i>sec</i> , <i>seh</i> , <i>sek</i> , <i>sel</i> , <i>sem</i> , <i>seo</i> , <i>tsi</i> , <i>eta</i> , <i>eth</i> , <i>etd</i> , <i>luk-PV</i> ^a , <i>lukM</i> , <i>edn</i>	<i>sea</i> , <i>seh</i> , <i>seh</i> , <i>sek</i> , <i>sel</i> , <i>sap</i> , <i>eta</i> , <i>eth</i> , <i>etd</i> , <i>luk-PV</i> ^a , <i>lukM</i> , <i>edn</i> , <i>hly</i>	<i>sea</i> , <i>sec</i> , <i>seh</i> , <i>sek</i> , <i>seq</i> , <i>tsi</i> , <i>eta</i> , <i>eth</i> , <i>etd</i> , <i>luk-PV</i> ^a , <i>lukM</i> , <i>edn</i>	<i>sea</i> , <i>seh</i> , <i>sec</i> , <i>sek</i> , <i>sed</i> , <i>eta</i> , <i>eth</i> , <i>luk-PV</i> ^a , <i>lukM</i> , <i>edn</i>	<i>sea</i> , <i>seh</i> , <i>sec</i> , <i>sed</i> , <i>seh</i> , <i>sek</i> , <i>sel</i> , <i>sem</i> , <i>seo</i> , <i>sap</i> , <i>ser</i> , <i>tsi</i> , <i>eta</i> , <i>eth</i> , <i>lukM</i> , <i>edn</i>
Variably positive (%)	<i>sea</i> (86), <i>sed</i> (49), <i>ser</i> (49), <i>hly</i> (13)		<i>seh</i> (22), <i>sed</i> (66), <i>sep</i> (44), <i>ser</i> (66), <i>hly</i> (11)	<i>sep</i> (87), <i>hly</i> (25)	
Susceptibility pattern					
Always resistant	Pen, Met, Flq	Pen, Met, Fus	Pen, Met, Flq	Pen, Met, Flq	Pen, Met, Kan, Fus
Variably resistant (% resistant)	Kan (75.3), Tob (75.3), Gen (2.6), Ery (50.6), Lin (53.2), Pri (7.8), Rif (1.3), Fos (9.1), Fus (9.1), Sxt (96.1)	Kan (28), Tob (28), Ery (14)	Kan (33), Tob (33), Ery (11)	Ery (12), Lin (12)	Ery (25)
Always susceptible	Tec, Van	Gen, Flq, Lin, Pri, Rif, Fos, Sxt, Tec, Van	Gen, Lin, Pri, Fus, Rif, Fos, Sxt, Tec, Van	Kan, Tob, Gen, Pri, Fus, Rif, Fos, Sxt, Tec, Van	Tob, Gen, Flq, Lin, Pri, Rif, Fos, Sxt, Tec, Van

^a *spa*, staphylococcal protein A; *ccr*, cassette chromosome recombinase; *tsi*, toxic shock syndrome toxin 1 gene; *luk*, staphylococcal leukocidin; *hly*, beta-hemolysin; *edn*, epidermal cell differentiation inhibitor; *sea*, exfoliatin A; *eth*, exfoliatin B; *etd*, exfoliatin D; Pen, penicillin; Met, methicillin; Kan, kanamycin; Tob, tobramycin; Gen, gentamicin; Ery, erythromycin; Lin, lincomycin; Pri, pristinamycin; Rif, rifampin; Fos, fosfomicin; Van, vancomycin; Tec, teicoplanin; Sxt, trimethoprim-sulfamethoxazole; Fus, fusidic acid; Flq, fluoroquinolone.
^b One Geraldine clone isolate was negative for *agr*, *ser*, and *sel*.

Objectifs de l'étude

Certes, la présence de *S. aureus* dans les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose et le déclin de la fonction respiratoire de ces mêmes patients ne sont pas précisément corrélés à ce jour, mais il semble que l'expérience des soignants tende à affirmer le réel impact de *S. aureus* sur la symptomatologie respiratoire de certains patients.

Cette étude s'inscrit dans la recherche d'une meilleure compréhension de la dynamique de colonisation par *S. aureus* chez les patients atteints de mucoviscidose. Le nombre d'études portant sur le sujet traduit ce manque d'expérience concernant cette bactérie dans la mucoviscidose, au regard de la « production » sans cesse accrue de publications de travaux confrontant *P. aeruginosa* et mucoviscidose (**Figure 14**). Ce travail s'inscrit dans cette recherche d'étendre nos connaissances sur ce sujet.

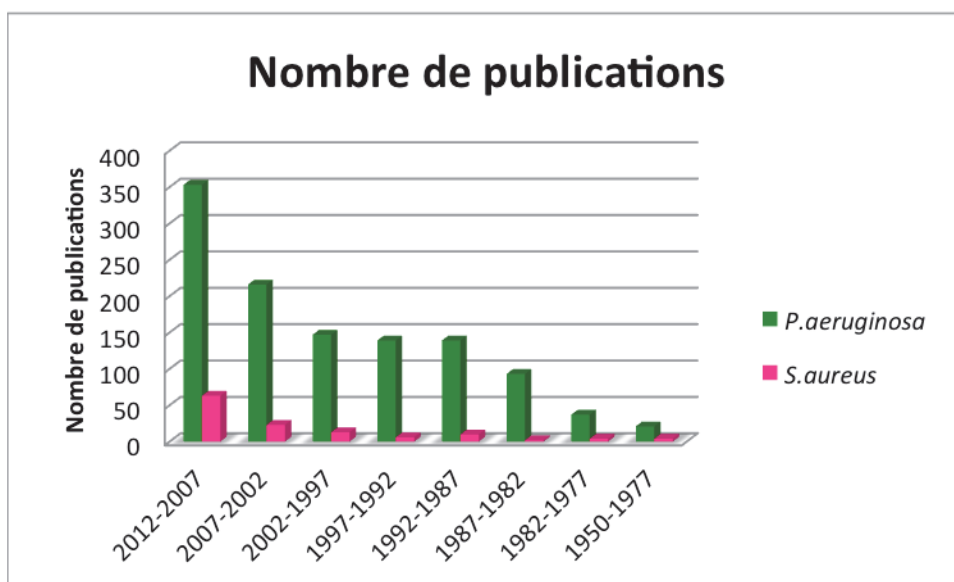


Figure 14 Confrontation du nombre de publications sur *P. aeruginosa* et mucoviscidose, et de *S. aureus* et mucoviscidose.

Les objectifs de ce travail ont été de décrire la dynamique de colonisations par *S. aureus* chez les patients atteints de mucoviscidose suivis au CRCM de Rouen, au moment de la transition SAMS/SAMR, et d'étudier les circonstances de survenue des SAMR chez ces patients. Cette description comprend l'étude des caractéristiques phénotypiques et génotypiques par *spa* typing des *S. aureus* sélectionnés, ainsi que l'analyse des antibiothérapies administrées avant et après l'émergence de SAMR.

Partie 2

IV. Patients, matériels et méthodes

A. Sélection des patients

Les patients concernés par l'étude sont atteints de mucoviscidose et sont suivis au CRCM de Rouen. Les patients sélectionnés ont eu au moins un isolement de SAMR dans leurs prélèvements bronchiques et/ou leurs crachats, sur une période de 8 ans, de 2004 à 2012. Les patients inclus dans notre étude ont présenté pendant cette durée une primocolonisation/infection et/ou au moins une recolonisation/infection à SAMR. La primocolonisation/infection à SAMR a été définie ici comme la toute première acquisition documentée de la bactérie depuis la naissance du patient, tandis que les recolonisation/infections représentent l'acquisition nouvelle d'un SAMR, après une période d'au moins 6 mois sans SAMR, comprenant au moins 3 prélèvements bronchiques réalisés à des mois différents, sans isolement de SAMR. Pour plus de simplicité dans la lecture de ce travail, l'émergence du premier SAMR sera par la suite nommée « colonisation » (primo- ou re-), sans préjuger de la notion d'infection cliniquement patente, ou encore « événement SAMR »

Les données concernant la microbiologie ont été récupérées à l'aide du logiciel MOLIS utilisé au laboratoire de bactériologie de Rouen. Ceci inclut les natures et les dates de prélèvement, les taux de SAMR, l'aspect quantitatif de *S. aureus* retrouvé dans le prélèvement, le profil de résistance phénotypique de chaque staphylocoque, ainsi que la présence de *P. aeruginosa* associée au prélèvement.

Les données relatives au profils des patients (caractéristiques épidémiologiques), les résultats des EFR, ainsi que les cures antibiotiques prescrites, ont été récupérées au sein des dossiers papiers et informatisés des patients du CRCM de Rouen, ainsi que dans le service de Pédiatrie du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Rouen.

Afin de garantir la plus grande exhaustivité possible dans le recueil des données, ainsi que pour la constitution du souchier de cette étude, le recueil débute dès janvier 2004, permettant ainsi un recul suffisant d'une année avant l'émergence de SAMR chez chaque patient.

B. Sélection des *S. aureus*

Les *S. aureus* inclus dans notre étude comprennent des SAMS et des SAMR.

L'« événement SAMR » est le SAMR réalisant une primo-colonisation/infection et/ou une recolonisation/infection chez les patients sélectionnés.

Les autres *S. aureus* inclus dans notre étude correspondent aux isolats entourant l'événement SAMR, sur une durée d'une année précédant ce SAMR d'intérêt, et d'une année suivant ce même SAMR.

Une dernière sélection a été réalisée devant le nombre important d'isolats de *S. aureus* répertoriés pour chaque patient. Lorsque pour un patient donné, l'événement SAMR était précédé ou suivi d'au moins 4 souches consécutives de même statut relatif à sa sensibilité à la méthicilline, seules 1 sur 2 souches ont été retenues.

C. Isolement et culture des *S. aureus*

La banque de souches conservée au laboratoire de bactériologie du CHU de Rouen comprend les souches d'intérêt médical isolées des prélèvements des patients suivis au CRCM de Rouen. Ces souches sont conservées dans un milieu nutritif liquide, congelé à -20°C. Les souches de *S. aureus* en font ainsi partie.

Les souches sélectionnées dans notre étude ont été tout d'abord décongelées sur une gélose nutritive de type trypticase soja (Biomérieux), composée d'un mélange de peptones permettant la croissance de micro-organismes non-exigeants. Le cas échéant, en présence d'une souche plus difficile à décongeler, des géloses enrichies au sang, de type gélose columbia additionnée de 5% de sang de cheval (Biomérieux) ont été utilisées.

Dans les cas où plusieurs souches de *S. aureus* ont été congelées ensemble, la réalisation d'un antibiogramme sur une gélose Mueller-Hinton (Biorad) a permis d'isoler les souches.

D. Séquençage du gène *spa*

Le séquençage du gène *spa* comporte plusieurs étapes : l'extraction de l'ADN bactérien, l'amplification du gène *spa*, une réaction de séquence et enfin le séquençage du gène. Ces réactions sont ponctuées d'étapes de purification des produits d'amplification. La méthode globale de séquençage utilisée ici, nommée Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS), dérivée de la méthode de Sanger (Sanger, Nicklen, and Coulson, 1977) consiste en un séquençage par incorporation cyclique de terminateurs marqués. Les modalités concernant plus précisément le *spa* typing s'appuient sur les références suivantes : (Kuhn, Francioli, and Blanc, 2007; Strommenger et al., 2006).

1. Extraction

L'extraction de l'ADN bactérien de chaque souche de *S. aureus* a été réalisée à partir d'une ou de plusieurs colonies, à l'aide du kit InstaGene™ (Biorad), selon les recommandations du fabricant.

2. PCR

La quantité d'extrait d'ADN ajoutée au mix de réaction d'amplification ou PCR (polymerase chain reaction) est de 10 µL d'extrait dilué au dixième.

Le mix de PCR *spa* est préparé selon le tableau récapitulatif suivant :

Amorce <i>spa</i>	Quantité pour 1 tube (µL)
Go Taq Green Master Mix de la marque Promega	12,5
Amorce <i>spa</i> 1113 à 50 µM	0,25
Amorce <i>spa</i> 1514 à 50 µM	0,25
Eau distillée stérile	2
Volume total	15

Les séquences des amorces *spa* sont les suivantes :

<i>spa</i> 1113	5' TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC 3'
<i>spa</i> 1514	5' CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT 3'

Le programme d'amplification appliqué comprend 50 cycles selon le schéma suivant :

- 95°C pendant 5min
- 10 cycles « touch down » avec diminution de 1°C de la température d'hybridation à chaque cycle : 95°C pendant 30sec, 65°C pendant 30sec, 72°C pendant 1min ;
- 40 cycles : 95°C pendant 30sec, 55°C pendant 30sec, 72°C pendant 1min ;
- 72°C pendant 5min
- 4°C à l'infini.

L'amplification des produits de PCR est vérifiée grâce à une migration électrophorétique, en gel d'agarose standard à 2%. Le marqueur fluorescent Gel RedTM Nucleic Acid Gel Stain (10000X in water; Biotium) est incorporé au gel. La migration s'effectue à 130 V pendant 1 heure.

3. Purification des produits de PCR

Les produits de PCR sont ensuite purifiés en utilisant le coffret Purif Nucleospin[®] Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel), selon les recommandations du fabricant.

4. Réaction de séquence

L'amplicon purifié est ajouté au pré-mix de réaction de séquence.

La préparation de ce pré-mix suit le tableau récapitulatif suivant :

	Quantité pour 1 tube (µl)
DTCS Quick Start Master Mix (Beckman)	4
Eau distillée	10,7
Amorce (50 µM)	0,3
Volume total	15

Le pré-mix de réaction de séquence Beckman Coulter fait partie d'un kit (GenomeLab™ DTCS Quick Start Kit). Ce pré-mix DTCS contient une ADN polymérase, des dNTPs, des nucléotides « terminateurs » marqués par des fluorochromes (ddUTP, ddGTP, ddCTP, ddATP) ainsi qu'un tampon de réaction.

L'amorce utilisée de façon prioritaire dans cette étude est l'amorce « sens » ou F (forward) *spa* 1113. L'amorce « anti-sens » ou R (reverse) *spa* 1514 a été utilisée dans un second temps, en cas de difficultés d'analyse des séquences obtenues par l'amorce F.

Le mélange contenant l'amplicon purifié (1µl) et le mix de réaction de séquence (15 µl), complété à 20 µl par de l'eau distillée, est incubé dans un des thermocycleurs du laboratoire de bactériologie.

Le programme de la réaction de séquence comprend 60 cycles selon le schéma suivant :

- 95°C pendant 2 min ;
 - 96°C pendant 10 sec ;
 - 50°C pendant 10 sec ;
 - 60°C pendant 10 sec ;
 - 4°C à l'infini.
- } Répétés 60 fois

5. Purification des produits de séquence

Les produits de la réaction de séquence sont ensuite purifiés par la méthode de purification à l'éthanol. La première étape consiste à arrêter la réaction par adjonction de 5 µl d'une solution « stop » dans chaque tube. Cette solution « stop » est préparée extemporanément selon les proportions suivantes :

	Quantité pour 8 tubes (µl)
Acétate de sodium (3M)	20 µl
Eau distillée	16 µl
EDTA (0,5M)	4 µl
Glycogène	10 µl

Le glycogène provient du kit Beckman GenomeLab™ DTCS Quick Start Kit.

La purification à l'éthanol pour chaque tube suit le protocole suivant :

- ajout de 60 µl d'éthanol froid à 95% ;
- agitation ;
- centrifugation 10 min à 3500 tr/min ;
- élimination du surnageant ;
- ajout de 200 µl d'éthanol froid à 70% ;
- centrifugation 3 min à 3500 tr/min ;
- élimination du surnageant ;
- ajout de 200 µl d'éthanol froid à 70% ;

- centrifugation 3 min à 3500 tr/min ;
- élimination du surnageant ;
- séchage pendant 10 min au speed vac® ;
- ajout de 40 µl de SLS (Sample Loading Solution) (Beckman Coulter), solution de dépôt de l'échantillon ;
- agitation ;
- repos de 15 à 30 min.

Les produits de réaction de séquence purifiés sont ensuite transférés dans une plaque Beckman Coulter et protégés d'une éventuelle évaporation par adjonction d'une goutte d'huile minérale (Beckman Coulter). Une plaque de microtitration est en parallèle préparée, en remplissant de façon identique à la plaque de séquençage avec du tampon de séparation (Beckman Coulter).

6. Séquençage

Les échantillons sont placés dans le séquenceur Beckman Coulter CEQ8000 Genetic Analysis System. Le séquenceur est programmé avec les paramètres « 500.550 pb 15 sec », qui correspond à un temps d'injection de 15 sec.

7. Analyse des séquences

Les séquences obtenues ont été analysées grâce au logiciel Bioedit d'alignement de séquences. L'attribution du *spa* type a été effectuée grâce à la base de donnée *spaTyper* (<http://fortinbras.us/cgi-bin/spaTyper/spaTyper.pl>), accessible gratuitement. Cette application permet d'identifier les domaines répétés du gène *spa* et d'attribuer un *spa* type, en se fondant sur les nomenclatures officielles Kreisthwirth (Shopsin et al., 1999) et Ridom (Harmsen et al., 2003). Les arbres phylogénétiques, fondés sur les homologues de séquences nucléotidiques entre isolats ont été construits à l'aide du programme MEGA v3.1 (Tamura et al., 2007).

E. Recueil des antibiothérapies

Un précédent travail, dans le cadre du Diplôme Universitaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse, réalisé au CHU de Rouen en 2011, a permis le recueil des antibiothérapies. La durée de recueil étant légèrement différente, ces traitements correspondent à une période de 6 mois précédant et suivant la primo- ou re-colonisation à SAMR. Cette période a été choisie comme étant la plus pertinente en terme d'impact des antibiotiques sur l'émergence de SAMR en fonction du temps.

Pour chaque patient, la totalité des antibiothérapies, quelle que soit leur mode d'administration, ainsi que les posologies et les durées de cures ont été collectées.

V. Résultats

A. Descriptif des patients

Les patients suivis au CRCM de Rouen concernés par cette étude sont au nombre de **24**, avec 8 patients de sexe féminin et 16 de sexe masculin. Parmi ces patients, 13 sont suivis au CRCM enfant, et 11 au CRCM adulte, actuellement. Les caractéristiques démographiques de ces patients sont comparées aux données spécifiques du CRCM de Rouen de l'année 2010, ainsi qu'aux données globales de la France dans le **tableau 9** (Vaincre la Mucoviscidose and Ined, 2010a).

Tableau 9 Caractéristiques démographiques des patients concernés par notre étude, en comparaison aux données spécifiques au CRCM de Rouen en 2010 et à la France entière (Vaincre la Mucoviscidose and Ined, 2010a).

	Notre étude		CRCM de Rouen 2010		France 2010	
	N	%	N	%	N	%
Nombre de patients	24	100,0	146	100,0	5758	100,0
Femmes	8	33,3	67	45,9	2800	48,6
Hommes	16	66,7	79	54,1	2958	51,4
Enfants	13	54,2	77	52,7	3040	52,8
Adultes	11	45,8	69	47,3	2718	47,2
Génotype						
$\Delta F 508/\Delta F 508$	13	54,2	58	39,7	2511	43,6
$\Delta F 508/$ autre	7	29,1	46	31,8	1506	26,3
Autre/autre	4	16,7	42	28,8	1558	26,9

B. Descriptif des *S. aureus* étudiés

Ces 24 patients ont eu au moins un isolement de SAMR sur la période 2004 - 2012. Parmi ces patients, **32 évènements SAMR** ont été recensés, soit 15 primocolonisations et 17 recolonisations. L'âge moyen de la primocolonisation est de 13,8 ans (médiane : 9 ans), tandis que celui des recolonisations est plus élevé, de 18,1 ans (médiane : 16 ans). En 2012, seuls 3 patients parmi les 24 sont considérés comme colonisés de façon chronique (avec 2 patients à statuts indéterminés en raison d'un transfert vers un autre CRCM, et d'un patient dont la période d'étude de 6 mois est actuellement incomplète, car en cours).

On peut noter qu'à l'échelle du CRCM de Rouen, sur la période 2004 - 2012, 56 patients différents ont eu au moins un isolement de SAMR. Sur l'année 2012 (de janvier à octobre), 9 patients

ont eu au moins un SAMR (2 enfants et 7 adultes) ; au total, donc, environ 5% des patients suivis au CRCM de Rouen en 2012. Sept patients porteurs de SAMR sont considérés comme colonisés chroniques (uniquement des adultes). Enfin, en 2012, seuls 3 patients parmi les 24 retenus dans cette étude sont colonisés de façon chronique.

En comparaison au taux de colonisation par SAMR au CRCM de Rouen (**Figure 15**), les patients concernés par cette étude ne représentent qu'un échantillon de cette population.

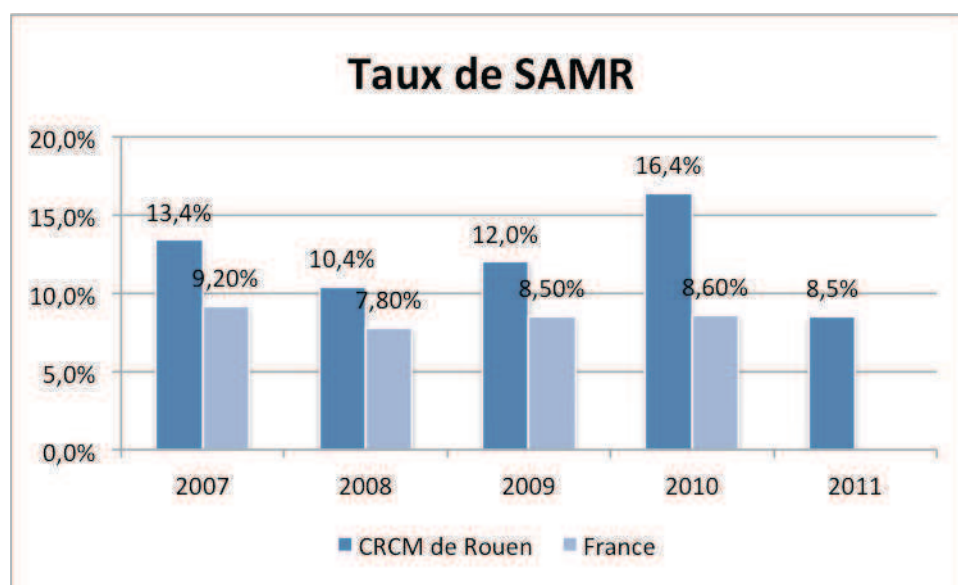


Figure 15 Taux de SAMR au CRCM de Rouen de 2007 à 2011 (données internes au laboratoire) et en France pour les années 2007 à 2010 (Vaincre La Mucoviscidose, 2007; Vaincre La Mucoviscidose, 2008; Vaincre La Mucoviscidose, 2009; Vaincre la Mucoviscidose, 2010). En 2007, 2008 et 2009 la différence des taux de SAMR est non-significative ($p=0,11$; $p=0,3$; $p=0,19$ respectivement) au contraire de l'année 2010, où le taux de SAMR au CRCM de Rouen est significativement supérieur ($p=0,001$) à celui observé à l'échelle nationale des CRCM (test du χ^2). La prévalence des SAMR à Rouen a également significativement diminué en 2011, en comparaison de 2010 ($p=0,03$).

Au total, 171 isolats de *S. aureus* ont été répertoriés et retenus pour l'étude à partir des 24 patients : 94 SAMS (55%) et 77 SAMR (45%). Seuls 164 isolats ont pu être séquencés, en raison d'un isolat non congelé (SAMR d'une primocolonisation), de 3 isolats n'ayant pu être amplifiés par les amorces utilisées (2 SAMR, dont 1 SAMR d'une primocolonisation, et 1 SAMS), et de 3 isolats dont la séquence était ininterprétable. Sur les 164 isolats séquencés, 91 sont des SAMS et 73 sont des SAMR. Le nombre de prélèvements retenu se situe entre 3 et 15 par patient. Le nombre d'isolat s'échelonne quant à lui de 3 à 20 par patient. Pour 7 patients, une co-colonisation par au moins 2 souches de *S. aureus* différents phénotypiquement ou génotypiquement a été retrouvée au moins une fois sur la période d'étude.

Ce travail est centré sur « l'évènement SAMR », une primo- ou une recolonisation. Mais s'intéressant plus largement à la dynamique de colonisation par *S. aureus*, il prend donc en compte les

isolats de *S. aureus* qui précèdent « l'événement SAMR », et aussi ceux qui suivent. En outre, 5 patients ont présenté une co-colonisation SAMS/SAMR lors de leur « événement SAMR » ; pour l'un d'entre eux (une recolonisation), cette émergence de SAMR s'est accompagnée de 3 isolats différents de SAMS associés. Ces isolats de SAMS, retrouvés en même temps que le SAMR d'intérêt, ont tous été analysés lors de cette étude.

Il est à noter que, sur les 32 événements SAMR, 24 correspondaient à des périodes où les patients étaient également colonisés à *Pseudomonas aeruginosa* (75%).

C. Profils de sensibilités aux antibiotiques des isolats étudiés

Les pourcentages de sensibilité aux principales molécules antistaphylococciques, en fonction du statut SAMS ou SAMR, sont présentés dans le **tableau 10**.

Tableau 10 Relevé des sensibilité de chaque isolat, selon leur statut SAMS ou SAMR.

Antibiotiques	% d'isolats SAMS sensibles (n=94)	% d'isolats SAMR sensibles (n=77)
Sensible	14	0
Pénicilline	21	0
Oxacilline	100	0
Tobramycine	83	8
Amikacine	83	9
Gentamicine	85	99
Erythromycine	68	39
Lincomycine	83	51
Pristinamycine	89	90
Ofloxacin	92	18
Cotrimoxazole	89	99
Rifampicine	97	71
Acide fusidique	90	87
Fosfomycine	96	88
Linézolide	96	100
Vancomycine	100	100
Teicoplanine	100	99

Les principaux profils de résistance rencontrés ont été pour les SAMS, la résistance à la pénicilline isolée (43%) et les résistances associées à la pénicilline et à l'érythromycine (10%). Par contre, 31% de SAMS ont présenté des profils plutôt originaux, comme des résistances aux

aminosides de type tobramycine - amikacine ou tobramycine – amikacine - gentamicine, des profils de nombreuses résistances associées, ou des résistances isolées par exemple à l'ofloxacine, et, pour une des patientes, une résistance au cotrimoxazole, à la pristinaamycine et au linézolide.

Pour les SAMR, l'association de résistances aux aminosides (phénotype tobramycine - amikacine) et à l'ofloxacine (69%) était présente majoritairement. La résistance aux macrolides était quant à elle essentiellement due à un phénotype MLS_B (constitutif ou inducible) et souvent présente en plus des résistances aux aminosides et aux fluoroquinolones.

Parmi les 77 SAMR, 1 seule souche n'avait qu'une résistance isolée à l'oxacilline. La recherche par PCR du gène *mecA*, déterminant majeur de la résistance à l'oxacilline chez les staphylocoques, a été effectuée sur l'ensemble des isolats de SAMR de primocolonisation ou de recolonisation, ainsi que sur certains isolats SAMS qui pré-existaient chez certains patients, juste avant la détection du SAMR : tous les SAMR possédaient bien le gène *mecA*, tandis qu'aucun n'a été retrouvé parmi les isolats de SAMS analysés.

D. Génotypage des isolats (« *spa*-typing »)

Sur les 171 isolats de *S. aureus* répertoriés, 164 ont pu être séquencés. Le nombre d'isolats étudiés par patient varie de 3 à 20. La diversité génétique des isolats étudiés par *spa*-typing est représentée sur l'arbre phylogénétique de la **figure 16**.

L'analyse des séquences nucléotidiques a permis d'identifier un *spa* type répertorié dans les bases de données internationales (spa.ridom.de/spatypes.shtml) pour 152 isolats, tandis que 12 séquences nucléotidiques ne correspondaient à aucun génotype *spa* répertorié dans les bases de données.

Les 35 *spa* types différents retrouvés, tous phénotypes confondus, sont représentés sur la **figure 17**. Huit autres génotypes *spa*, non attribués, mais bien différenciés sur le dendrogramme, s'ajoutent à ces 35 *spa* types, totalisant ainsi **43** *spa* types différents.

Les *spa* types retrouvés en fonction du phénotype SAMS ou SAMR sont représentés sur la **figure 18**. Pour les SAMS, 23 *spa* types différents ont été répertoriés, et 5 génotypes *spa* restent non identifiés. En ce qui concerne les SAMR, 17 *spa* types ont pu être attribués, et 3 génotypes *spa* sont non identifiés. En outre, 4 *spa* types ont été retrouvés à la fois chez les SAMS et les SAMR (**Figure 19**). Enfin, 2 *spa* types largement majoritaires, représentent 43% des isolats : t002 et t008.

Bien que certains *spa* types portent des noms différents, leur proximité phylogénétique (**Figure 16 et annexe**), s'explique par la délétion d'un bloc, d'un motif de séquence répétée du gène *spa*. Il s'agit donc d'un seul et unique événement génétique ponctuel, qui n'a pas plus de signification phylogénétique qu'une mutation ponctuelle ; les *spa* types impliqués correspondent le plus souvent à une même souche, en cours de diversification génétique. Par exemple, pour le t002, t1113 est très proche phylogénétiquement ; les *spa* t2164 et, dans une moindre mesure t3217, le sont

également. Concernant t008, certains *spa* types sont véritablement extrêmement proches de ce dernier. Il s'agit des *spa* types t121, t1709, t648 et t024.

Une des questions de ce travail porte sur la dynamique de colonisation par *S. aureus* chez un même patient, notamment au moment de la charnière SAMS/SAMR.

La colonisation chronique par SAMS comporte deux types de circonstances : la persistance d'une souche, ou le changement fréquent de souche au cours du temps (**Figure 20**). Parmi les 24 patients, quel que soit leur nombre « d'évènements SAMR » étudiés, 11 d'entre eux ont présenté une colonisation par une souche de même génotype *spa*, ponctués de clones intercurrents, et 3 patients ont été colonisés par plusieurs souches, sans clone redondant. Les 10 autres patients n'étaient pas colonisés de façon chronique par SAMS sur la période étudiée.

Pour 1 patient, dont 2 évènements SAMR ont été étudiés (la primocolonisation et une 1 recolonisation), aucun SAMS n'avait été détecté avant l'émergence de SAMR, et seuls des isolats de SAMR ont été isolés sur l'année suivant ses primo- et recolonisations ; tous les isolats appartenaient au même *spa* type.

Le second axe de cette étude concerne l'évènement SAMR. Deux circonstances de survenue ont pu être observées : l'acquisition d'un nouveau génotype ou l'évolution possible du SAMS présent au préalable.

L'acquisition d'un SAMR d'un nouveau génotype a été retrouvée dans la majorité des cas (18 « évènements SAMR »). Ceci est représenté sur la **figure 21 (patient A)**, où le SAMR présente un *spa* type t008 sur une colonisation à SAMS t160 et t509. Dans 5 cas, le SAMR avait un *spa* type identique à au moins 1 SAMS présent au préalable chez le patient, suggérant une évolution potentielle de la souche de SAMS sous-jacente (**Figure 21**). Pour 7 cas, aucun SAMS n'a été isolé avant la colonisation à SAMR, et pour 2 souches, le statut n'a pu être déterminé (1 souche non congelée et 1 souche non amplifiée). Ce qui représente donc **78%** des SAMR nouvellement acquis, et **22%** de SAMR éventuellement reliés aux SAMS présents au préalable.

Dans les cas où la primo- ou recolonisation par SAMR a été suivie d'autres isollements de SAMR (18 « évènements SAMR »), 12 « évènements SAMR » ont été suivis d'au moins 1 SAMR de *spa* type identique aux leurs (4 évènements SAMR suivis de SAMR de *spa* différents et 2 indéterminés). De plus, chez les 15 patients ayant eu d'autres isolats de SAMR, 9 patients ont présenté une unique souche de SAMR (même *spa* type) et 2 patients ont été majoritairement colonisés par la même souche (2 SAMR de *spa* types différents et 8 SAMR de *spa* types identiques pour un patient et 1 SAMR de *spa* type différent et 4 SAMR de *spa* types identiques pour une patiente). Ce qui fait au total, une majorité de patients ayant eu plus d'un isolat de SAMR (62,5%), et une majorité de colonisation par une même souche de SAMR (environ 73%).

Enfin, certains patients pour lesquels plusieurs épisodes de recolonisation par SAMR ont été étudiés, ont présenté une résurgence de souches de SAMR de même *spa* type au fil des

recolonisations. Par exemple, l'un des patients, pour lequel le *spa* type t024 était retrouvé à 3 reprises lors de sa primocolonisation par SAMR en 2006-2007, ré-émerge en 2011, lors de sa recolonisation.

La colonisation à SAMS suivant « l'événement SAMR » a également été investiguée. Sur les 19 évènements SAMR ayant eu au moins 1 SAMS isolé dans l'année suivante, 14 ont été suivis d'au moins 1 SAMS de *spa* type différent du SAMR. Dans 4 cas, 1 SAMS ou plus a présenté un *spa* type identique au SAMR (1 cas indéterminé).

Une patiente a présenté des caractéristiques de colonisation à *S. aureus* originales. Cette patiente était colonisée par un SAMS t002 essentiellement (et 3 autres SAMS de *spa* types différents), et « l'événement SAMR » lors de l'étude (une recolonisation) a été le fait d'un SAMR t121. L'originalité de cette colonisation réside dans l'acquisition de nouvelles résistances aux antibiotiques au fil du temps (**tableau 11**). Le premier SAMS t002 présent au préalable, producteur de pénicillinase était également résistant aux aminosides (tobramycine, amikacine et gentamicine), à l'érythromycine, à l'acide fusidique et au cotrimoxazole. Les SAMS t002 suivants ont développé des résistances à tous les macrolides (lincomycine et pristinamycine), au linézolide, à la rifampicine et à la fosfomycine. Une seule souche parmi ces SAMS t002 est de *spa* type très proche de ce dernier, t2164. Elle est apparue une seule fois après la recolonisation par SAMR, et présente des résistances « typiques » des SAMS précédents (notamment cotrimoxazole et linézolide) associées à une résistance à l'ofloxacine, qui est présente uniquement chez les SAMR de ce patient. Ceci suggère l'éventualité d'une acquisition de résistances au sein d'une même souche (ou d'une souche très proche génotypiquement) au cours du temps.

Tableau 11 Evolution des résistances antibiotiques d'un SAMS t002 chez une même patiente.
 Abréviations : Pénicilline (P), tobramycine (TM), amikacine (AN), gentamicine (GM), érythromycine (E), lincomycine (L), pristinamicine (PT), cotrimoxazole (SXT), ofloxacine (OFX), oxacilline (OX), linézolide (LZD), rifampicine (RA), acide fusidique (FA).

Dates	SAMS/ SAMR	Numéro d'isolat	<i>spa</i> type	Phénotype de résistance
Juillet 2005	SAMS	49	t002	P, TM, AN, GM, E, SXT, FA
Novembre 2005	SAMS	50	t002	P, TM, AN, GM, E, L, PT, SXT, FA
Mars 2006	SAMS	51	t002	P, TM, AN, GM, L, PT
Mai 2006	SAMS	52	t002	P, TM, AN, GM, E, L, PT, SXT
Juillet 2006	SAMR	53	t121	P, OX, TM, AN, OFX
	SAMS	54 S	pas de <i>spa</i> type	P
	SAMS	54 LZD	t002	P, TM, AN, GM, LZD, SXT
	SAMS	54 E	t002	P, TM, AN, GM, E, L, SXT, LZD
Septembre 2006	SAMR	55	t121	P, OX, TM, AN, OFX
	SAMS	56	t002	P, TM, AN, GM, E, L, PT, SXT
Novembre 2006	SAMS	57	t002	P, TM, AN, GM, L, PT, FA
Décembre 2006	SAMS	58	t002	P, TM, AN, GM, E, L, PT, SXT, FA
Janvier 2007	SAMR	59	t648	P, OX, TM, AN, E, OFX, RA
	SAMR	60	t121	P, OX, TM, AN, OFX
	SAMS	61	pas de <i>spa</i> type	P
Mars 2007	SAMS	62	t002	P, TM, AN, GM, E, PT, SXT, RA
	SAMS	63	t2164	P, TM, AN, GM, L, PT, SXT, OFX, LZD
Avril 2007	SAMR	64	t121	P, OX, TM, AN, OFX
	SAMS	65	t002	P, TM, AN, GM, L, PT, SXT
Juin 2007	SAMS	66	t002	P, TM, AN, GM, FOS, LZD

Enfin, de façon plus globale, l'analyse des génotypes a révélé qu'une proportion non négligeable de patients partageait des souches génotypiquement identiques (**Figure 22**). Il s'agit des *spa* types t002 (8 patients), t008 (13 patients), t012 (3 patients), t571 (3 patients) et un génotype *spa* indéterminé partagé par 2 patients différents. Il s'est avéré que ces souches ne sont pas reliées dans le temps, ayant été acquises à des périodes bien différentes.

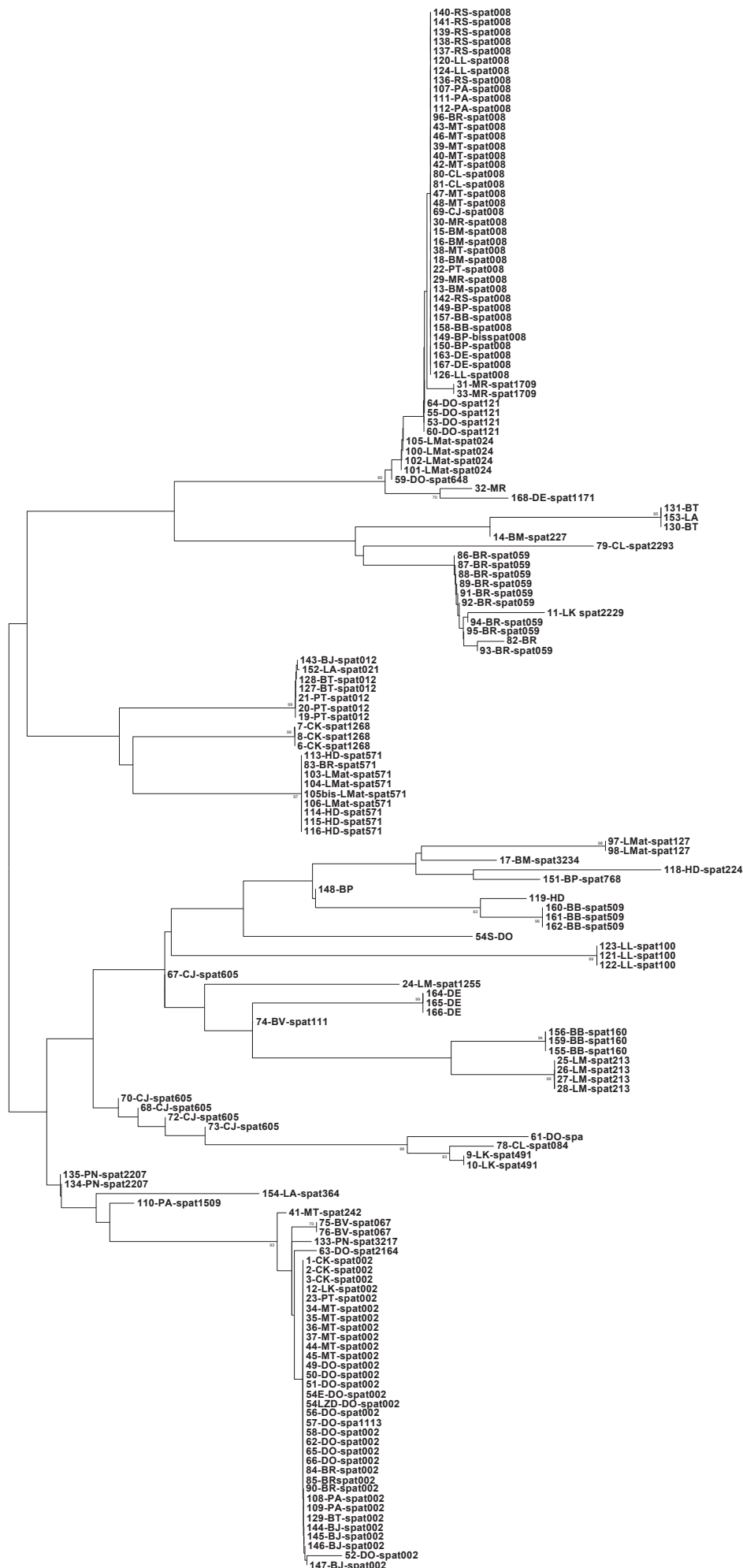


Figure 16 Diversité génétique des 164 isolats après *spa*-typing. Dénomination des isolats : « n° d'identification - initiales du patient porteur - *spa* type ». Absence de *spa* type si non répertorié dans les bases de données.

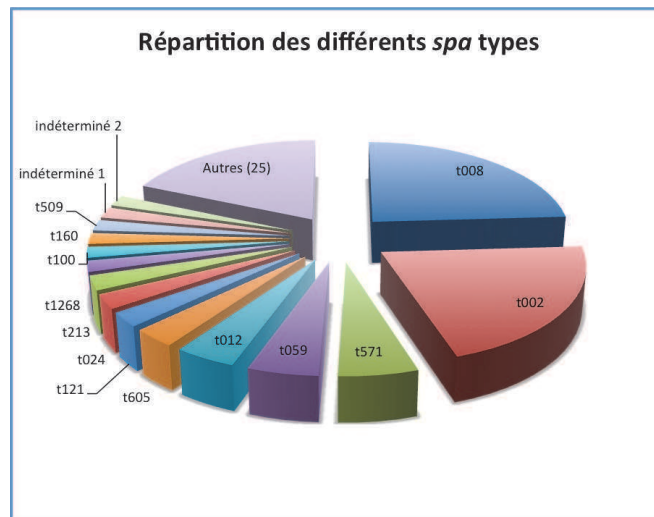


Figure 17 Répartition des 43 *spa* types différents.

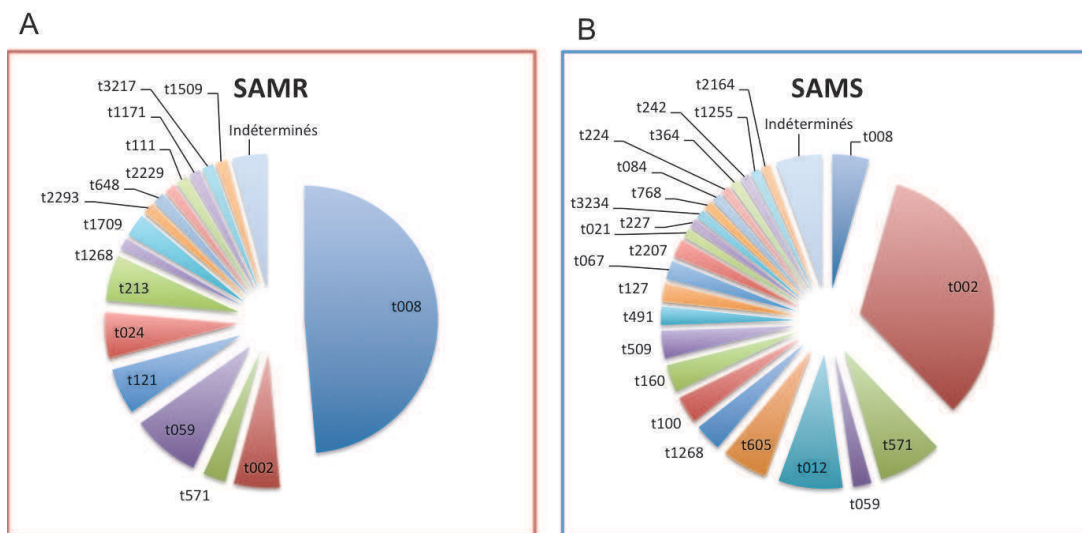


Figure 18 Diversité des SAMR (A) et des SAMS (B) retrouvés dans ce travail.

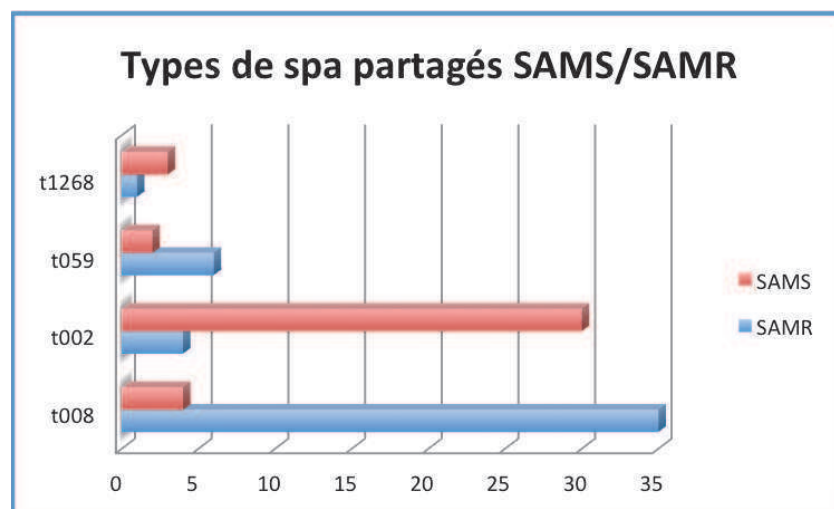
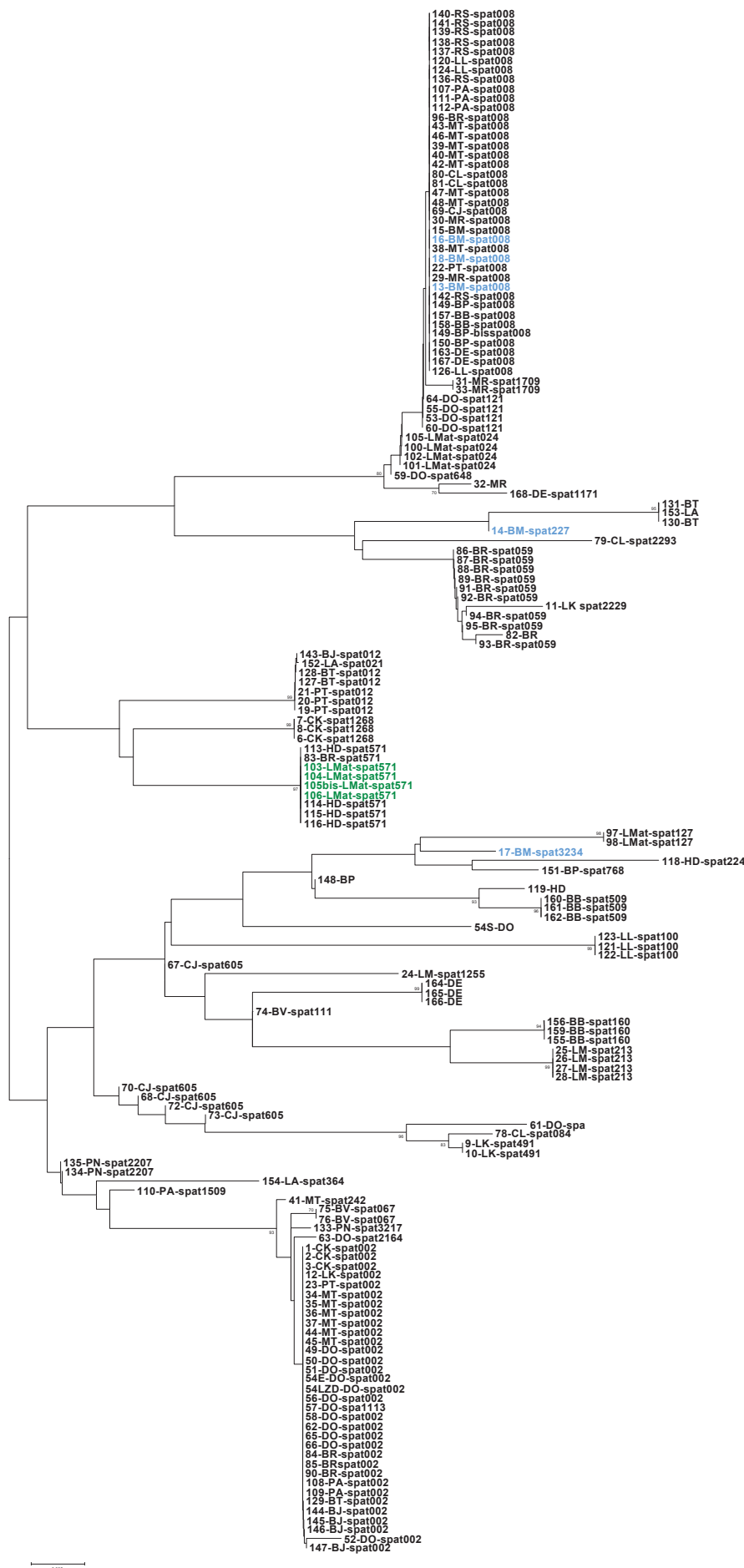


Figure 19 Certains *spa* types, au nombre de 4 (t002, t008, t059 et t1268), sont retrouvés à la fois chez des SAMS et des SAMR.



SAMS
Patient A

Mars 2006 : t008
Septembre 2006 : t027
Décembre 2006 : t008
Avril 2007 : t3234
Octobre 2007 : t008

SAMS
Patient B

Mai 2011
Décembre 2011
Février 2012
Mai 2012

t571

Figure 20 Colonisations par SAMS : changement fréquent de souche chez le patient A ou persistance d'une même souche (t571) chez le patient B.

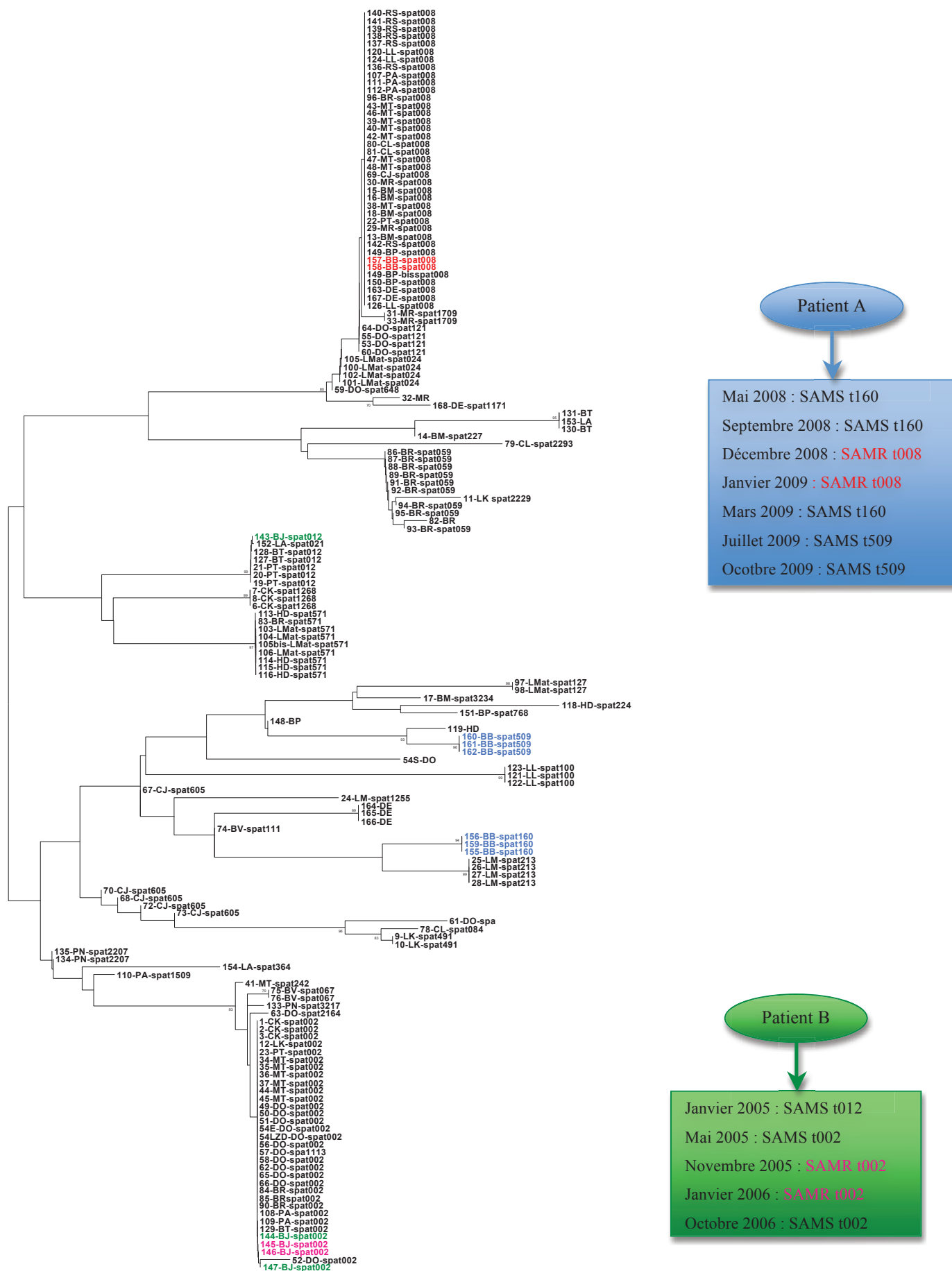


Figure 21 Acquisition d'un SAMR : acquisition d'une nouvelle souche (patient A) ou évolution potentielle d'un SAMS préexistant (patient B).

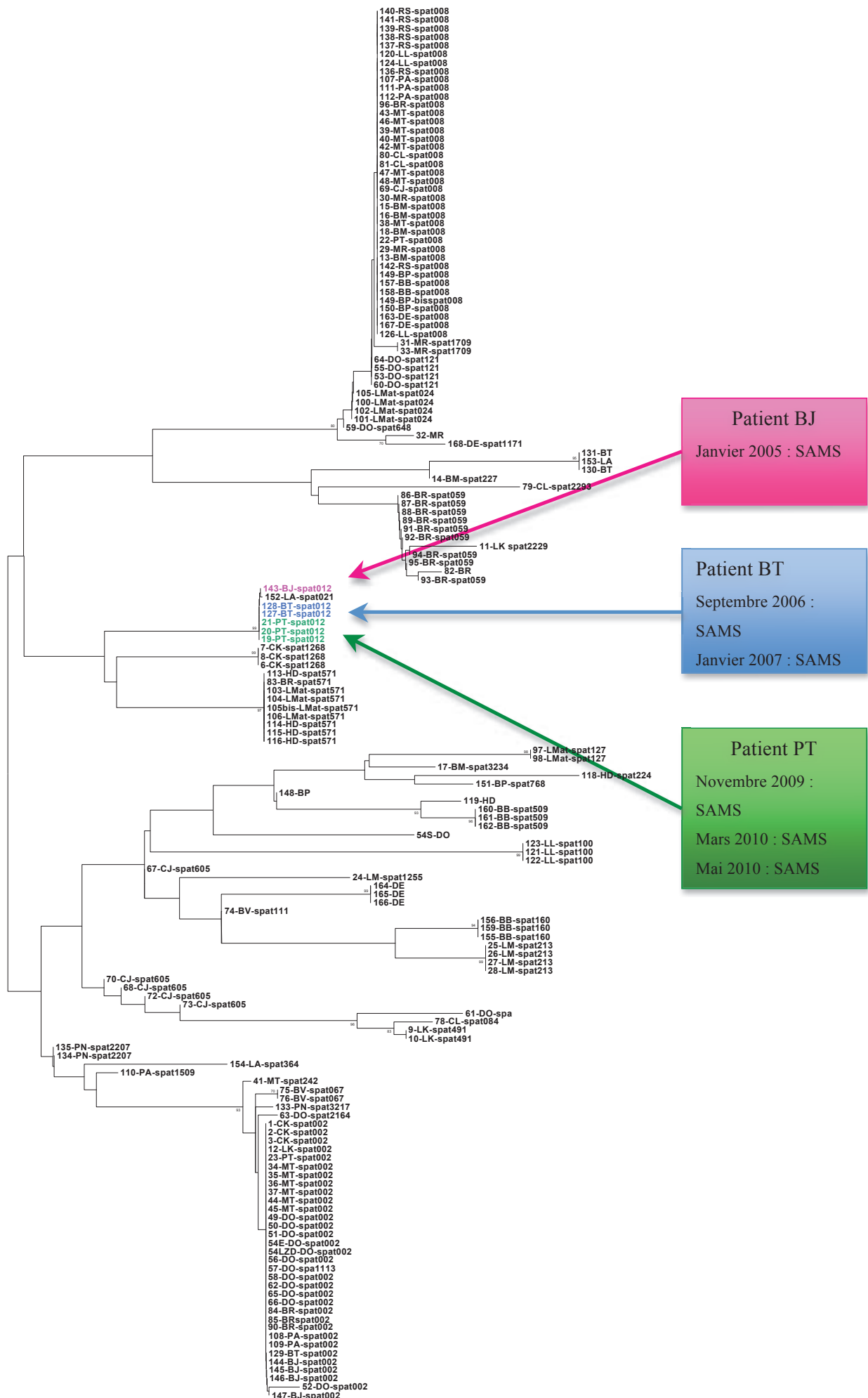


Figure 22 Exemple du *spa* type t012 partagé par 3 patients différents, mais à des périodes distinctes.

E. Antibiothérapies reçues autour de « l'événement SAMR »

L'étude des antibiothérapies comprend deux volets : les antibiothérapies prescrites avant « l'événement SAMR », et les cures prescrites après, spécifiquement à visée anti-SAMR.

1. Antibiothérapies prescrites avant « l'événement SAMR »

Les antibiotiques prescrits avant la primo- ou la recolonisation par SAMR ont été étudiés sur une période de 6 mois précédant ce SAMR. Cette période a été elle-même subdivisée en deux groupes : un groupe comprenant les antibiotiques prescrits dans les 3 mois avant l'événement SAMR, et ceux prescrits au delà des 3 mois, et jusqu'à 6 mois avant.

Une grande variété de molécules différentes a été répertoriée. Au total, **28** antibiotiques différents ont été prescrits sur cette période de 6 mois (**Tableau 12**). Parmi les molécules ou cures prescrites certaines étaient majoritairement représentées, comme l'amoxicilline-acide-clavulanique, l'association ceftazidime - tobramycine, la ciprofloxacine, le cotrimoxazole et la colimycine.

Tableau 12 Antibiotiques administrés dans les 6 mois précédant "l'événement SAMR".

Antibiotiques	N	Fréquence (%)
Tobramycine	25	15,2
Amoxicilline-acide clavulanique	20	12,2
Ciprofloxacine	19	11,6
Cotrimoxazole	16	9,7
Colimycine	14	8,5
Ceftazidime	13	7,9
Acide fusidique	9	5,5
Linézolide	7	4,3
Azithromycine	7	4,3
Pristinamycine	4	2,4
Doxycycline	4	2,4
Cefpodoxime	3	1,8
Amoxicilline	3	1,8
Rifampicine	3	1,8
Clarithromycine	2	1,2
Aztréonam	2	1,2
Lévofloxacine	2	1,2
Amikacine	1	0,6
Imipénème	1	0,6
Ceftriaxone	1	0,6
Oxacilline	1	0,6
Céfuroxime	1	0,6
Clindamycine	1	0,6
Gentamicine	1	0,6
Moxifloxacine	1	0,6
Méropénème	1	0,6
Vancomycine	1	0,6
Ethambutol	1	0,6

Les antibiothérapies potentiellement capables de sélectionner des SAMR ont été répertoriées sur la base de leur inactivité spécifique sur le SAMR de primo- ou de recolonisation qui leur correspond (information déduite du phénotype de résistance, à l'antibiogramme, du SAMR concerné). Ainsi, pour **65,6%** (21 SAMR) des « évènements SAMR », au moins une molécule éventuellement sélectionnante a été prescrite dans les 3 mois précédant (M-3) l'arrivée de ce SAMR. Ce sont de même, **84,4%** (27 SAMR) des SAMR qui ont été exposés à une antibiothérapie sélectionnante si l'on augmente la période à 6 mois (M-6) avant leur détection.

Pour **34,4%** (11 SAMR) des SAMR de primo- ou de recolonisations étaient retrouvés chez des patients qui avaient reçu au moins une molécule antibiotique active spécifiquement sur ces SAMR dans les mois précédant l'isolement du SAMR.

2. Cures antibiotiques visant « l'évènement SAMR »

Le second versant de cette étude des antibiothérapies comprend la prise en charge éventuelle de ces SAMR de primo- ou recolonisation, et l'analyse de celle-ci.

a) Prise en compte de l'évènement SAMR

Sur les 60 cures antibiotiques répertoriées pour ces 32 SAMR de primo- ou recolonisation, la notion de prise en compte de la bactérie a été recherchée et répartie en fonction du temps. Ainsi, la période d'étude de 6 mois suivant la détection de la bactérie a été divisée en 3 : les cures prescrites dans le mois suivant (ce qui exclut les antibiotiques prescrits à la date même du prélèvement, pouvant avoir été introduites en probabiliste en fonction des prélèvements antérieurs), celles prescrites dans les 3 mois (en excluant les éventuelles cures prescrites dans le mois suivant, afin d'éviter les redondances) et celles introduites dans les 6 mois suivants (sans prendre en compte les cures prescrites dans les 3 mois suivants, pour les mêmes raisons que précédemment). Le détail de ces prises en compte est retranscrit dans la **figure 23**. Les cures ont été comptabilisées une seule fois, à la date de leur prescription, en faisant donc abstraction de la durée d'administration.

Au total, sur les 32 SAMR, **81%** (26 SAMR) ont finalement été traités spécifiquement au cours des 6 mois suivants leur détection.

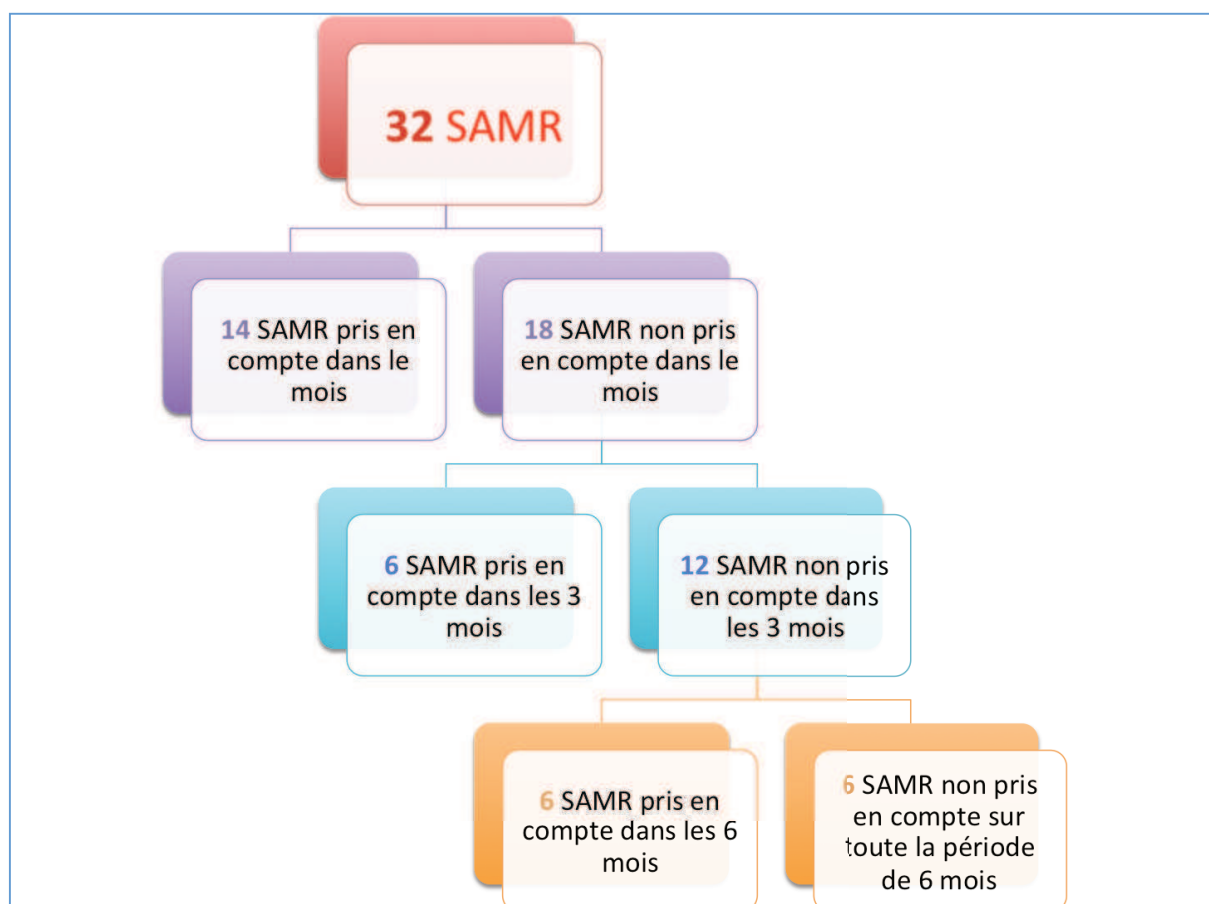


Figure 23 Représentation des prises en compte des évènements SAMR.

b) Nature des antibiothérapies prescrites à visée anti-SAMR

Toutes les cures antibiotiques, potentiellement actives sur les SAMR, et prescrites dans les 6 mois suivants l'isolement du SAMR de primo- ou recolonisation, ont été répertoriées (**Tableau 13**).

Dans certains cas, l'attribution de l'objectif « anti-SAMR » à la cure antibiotique répertoriée a été délicate, en raison de la potentielle activité de certaines molécules sur d'autres bactéries ou sur les SAMS. En règle générale, les cures anti-pyocyaniques étaient bien identifiées, et ne laissaient pas de doutes quant à leurs objectifs antibactériens. Dans d'autres situations, la recherche d'autres bactéries dans les prélèvements concomitants aux cures a été entreprise, afin de tenter d'expliquer la prescription. Certaines associations d'antibiotiques s'insèrent en outre dans une prescription plus large, comprenant une cure anti-pyocyanique et une cure anti-SAMR, pour laquelle une molécule peut être « partagée » entre les deux objectifs (par exemple, certains aminosides).

Tableau 13 Cures antibiotiques à visée anti-SAMR.

Cures antibiotiques à visée anti-SAMR	Nombre
Rifampicine + acide Fusidique	13
Cotrimoxazole	10
Linézolide	7
Cotrimoxazole + acide Fusidique	6
Pristinamycine	3
Doxycycline	2
Cotrimoxazole + Pristinamycine	2
Cotrimoxazole + Linézolide	2
Acide Fusidique + Clindamycine	2
Pristinamycine + Rifampicine	1
Cotrimoxazole + Gentamicine	1
Cotrimoxazole + Minocycline	1
Acide Fusidique + Gentamicine	1
Acide Fusidique + Gentamicine + Mupirocine	1
Acide Fusidique + Tobramycine	1
Pristinamycine + Ofloxacine	1
Pristinamycine + Clindamycine	1
Linézolide + Rifampicine	1
Linézolide + Mupirocine	1
Clindamycine + Gentamicine	1
Gentamicine + Mupirocine	1
Lévofloxacine	1
TOTAL	60

Par rapport aux recommandations principales énoncées dans la conférence de consensus de 2002 (Société Française de Pédiatrie and ANAES, 2002b), qui comprend les antibioprophylaxies secondaires et le traitement des exacerbations de façon indissociée, 35% des cures administrées (21 cures sur 60) figurent parmi celles décrites par la conférence de consensus 2002 (**acide fusidique / rifampicine, pristinamycine / rifampicine, linézolide et minocycline**).

Par ailleurs, **98%** des cures étaient présumées actives in vitro (c'est-à-dire d'après l'antibiogramme de la souche) sur le SAMR de primo- ou recolonisation.

c) Efficacité microbiologique des cures antibiotiques

L'efficacité des cures administrées a été étudiée sur son versant microbiologique. Deux catégories ont été identifiées : l'éradication du SAMR de primo- ou recolonisation ou, au contraire, la persistance du SAMR.

L'éradication du SAMR peut être totale ou transitoire. L'éradication totale est la disparition du SAMR après la cure, sur une période de 6 mois avec au moins 3 prélèvements réalisés à des mois différents, sans identification de SAMR. Une éradication transitoire est définie ici comme l'absence de SAMR sur le premier prélèvement après la cure, mais réapparaissant sur les prélèvements suivants. Ainsi, 32 cures SAMR (53%) ont totalement éradiqué le SAMR, tandis que 11 cures (18%) n'ont permis qu'une disparition transitoire du SAMR.

Parmi les « évènements SAMR » non-éradiqués, deux situations se sont présentées : une persistance de la bactérie sur le prélèvement suivant la cure sans diminution de la quantité de bactérie, à une puissance près, ou la diminution de la quantité de SAMR, de 2 log ou plus. La majorité des non-éradiqués ne présente aucune diminution de la quantité de SAMR (16 SAMR ou 27% du total des SAMR), tandis que seul 1 SAMR a vu sa quantité diminuée après la cure.

VI. Discussion

L'objectif de ce travail était d'essayer de mieux connaître la dynamique de colonisation par *S. aureus* des patients atteints de mucoviscidose suivis au CRCM de Rouen, en se focalisant sur la transition SAMS/SAMR. *Staphylococcus aureus* est beaucoup moins étudié, dans le cadre de la mucoviscidose, que *Pseudomonas aeruginosa*, et quand il fait l'objet de travaux, ce sont essentiellement les souches de SAMR qui sont étudiées ; très peu de données concernent les SAMS, et encore moins la transition SAMS/SAMR. Ce travail est donc axé sur l'émergence de SAMR chez ces patients, souvent déjà colonisés au préalable par une ou plusieurs souches de SAMS. Il vise à décrire phénotypiquement et génotypiquement les staphylocoques dorés isolés sur une période encadrant la primo- ou recolonisation à SAMR, et aussi à analyser les antibiothérapies reçues par les patients juste avant et juste après l'apparition du SAMR.

Vingt-quatre patients suivis au CRCM de Rouen entre les années 2004 et 2012 sont concernés par cette étude. C'est bien évidemment largement inférieur aux 146 patients suivis au CRCM de Rouen en 2010 et aux 165 suivis en 2011. Cependant, l'objectif initial de l'étude repose sur la primocolonisation par SAMR et non sur la totalité des patients ayant eu au moins un SAMR sur cette période. Entre 2004 et 2012, 56 patients ont eu au moins 1 isolement de SAMR ; 24 ont eu au moins 1 fois un SAMR en 2010, 14 en 2011 et seulement 9 en 2012 (dont 3 sont actuellement colonisés chroniques). Excepté en 2012, ces chiffres sont d'ailleurs toujours légèrement supérieurs à ceux indiqués à l'échelle nationale, probablement en raison de la méthode de détection particulière utilisée au laboratoire de bactériologie du CHU de Rouen. Les 56 patients ayant eu au moins un SAMR entre 2004 et 2012 n'ont pas pu tous être étudiés, d'une part en raison de la nécessité de disposer de souches conservées (souches congelées seulement depuis 2003) et de données cliniques facilement disponibles, et d'autre part en raison de patients transférés au CRCM de Rouen déjà colonisés à SAMR, dont les données de primocolonisation étaient donc inconnues et les souches indisponibles. Afin d'étendre le nombre de patients, dans le but de pouvoir travailler sur un échantillon le plus représentatif possible de la survenue de cette bactérie multirésistante, nous nous sommes également intéressés aux événements de recolonisation à SAMR.

Ces 24 patients sont cependant assez représentatifs de l'ensemble des patients suivis au CRCM de Rouen, avec un nombre d'enfant légèrement supérieur au nombre d'adulte, une majorité de sujets de sexe masculin, ainsi qu'une fréquence supérieure de patients présentant la mutation homozygote $\Delta F508/\Delta F508$, mutation la plus répandue. L'âge moyen de la primocolonisation à SAMR (13,8 ans) et celui de la recolonisation (18,1ans) sont également sans surprise, et concerne essentiellement la période d'adolescence (Vaincre la Mucoviscidose and Ined, 2010b). Ceci tend à

illustrer l'état déjà avancé de la pathologie respiratoire de ces patients, dont la majorité d'entre eux (75%) sont également colonisés à *P. aeruginosa*, signant un état respiratoire relativement sévère.

Afin d'étudier les circonstances de survenue des SAMR, ainsi que le devenir de la colonisation staphylococcique chez ces patients, la période choisie, s'étalant donc sur 2 ans pour chaque patient, a permis de recenser 171 isolats de *S. aureus*. La majorité de ceux-ci sont représentés par des SAMS (55%), mais laissent une place non négligeable aux SAMR (45%), donnant ainsi une large distribution des deux phénotypes à étudier et permettant d'évaluer *a priori* la dynamique de colonisation aussi bien des SAMS que des SAMR.

Les profils de résistance aux antibiotiques retrouvés dans cette étude sont eux même extrêmement variés. Des profils plutôt « typiques » s'associent à des associations de résistances plus originales. Chez les SAMR, les profils de résistance aux antibiotiques sont dans une grande majorité relativement classiques, avec une forte fréquence de résistance aux aminosides (92%) (Phénotype tobramycine - amikacine), et aux macrolides (62%). La résistance aux autres antibiotiques est comparable aux dernières données disponibles au niveau national en 2007, hors mucoviscidose, particulièrement en ce qui concerne le cotrimoxazole (1.7% en France *versus* 1% dans notre étude), l'acide fusidique (14% en France *versus* 13% dans notre étude) ou encore les glycopeptides (0.1% en France pour la vancomycine et la teicoplanine *versus* 0% pour la vancomycine et 1% pour la teicoplanine ici). De légères différences sont à noter pour les résistances à l'ofloxacine (de 89.4 à 95% en France, selon les études, *versus* 82% ici) (Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques ONERBA), l'érythromycine (49.3% en France *versus* 61% ici), ou encore la rifampicine (6.4% en France *versus* 29% ici). L'utilisation fréquente de l'azithromycine dans la mucoviscidose pourrait avoir un lien avec cette résistance plus fréquente à l'érythromycine. Ceci est probablement également le cas pour la rifampicine, bien plus utilisée chez ces patients que dans la population française globale. Seul 1 SAMR a présenté une résistance isolée à la méticilline, incitant à rechercher la présence du gène *mecA* par biologie moléculaire, qui a confirmé cette résistance et exclu l'éventualité d'une résistance à l'oxacilline liée au nouveau variant *mecC* (Laurent et al., 2012).

Chez les SAMS, près de 70% des souches présentaient des profils de sensibilité classiques : 14% des SAMS étaient sensibles à tous les antibiotiques testés (17,1% des SAMS en France) (Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques ONERBA); les souches résistantes uniquement aux pénicillines, ou résistantes aux pénicillines et aux macrolides étaient également très fréquentes, comme c'est le cas chez les SAMS en dehors de la mucoviscidose. La sensibilité à l'érythromycine (68%) était cependant légèrement inférieure à celle relevée au niveau national (78,4% en 2007), probablement toujours en raison de l'utilisation d'azithromycine au long cours. Les autres sensibilités sont, à l'échelle globale, proches de celles relevées au niveau national en 2007, notamment en ce qui concerne la rifampicine et l'acide fusidique (98,8% et 94,8%

respectivement). Cette différence de sensibilité entre SAMR et SAMS pourrait s'expliquer par la moindre utilisation de rifampicine avant le premier isolement de SAMR.

En revanche, 31% des SAMS ont présenté des profils de résistances atypiques, pouvant toucher par exemple tous les aminosides (résistance de type tobramycine - amikacine - gentamicine), le cotrimoxazole, ou encore l'ensemble des macrolides (pristinamycine incluse), et parfois originales, comme la résistance au linézolide. Cette dernière est parfaitement inhabituelle, au regard de sa faible fréquence, d'autant plus chez le SAMS. Elle serait plus facilement acquise sous traitement au long cours (Endimiani et al., 2011). Ceci n'a en fait concerné qu'une des patientes, colonisée de façon chronique. Bien que s'agissant d'une seule souche de *spa* type t002, ses profils de résistances ont varié au cours du temps, de façon incohérente ou aléatoire (par exemple, émergence d'une résistance qui disparaît sur les souches suivantes). Une analyse des antibiothérapies administrées à cette patiente a révélé une prise de linézolide au long cours. Cette colonisation chronique par SAMS, ponctuée de SAMR, présente de plus des co-colonisations simultanées par plusieurs « mutants ou variants » d'une même souche ancestrale. Notamment, dans le prélèvement de sa recolonisation par SAMR, 3 SAMS différents phénotypiquement ou génotypiquement ont été isolés. Deux SAMS t002 étaient résistants à la pénicilline, à tous les aminosides, au cotrimoxazole et au linézolide, et ne différaient que par l'addition de résistance aux macrolides pour une des souches. Le troisième SAMS était génotypiquement différent des deux autres et n'était résistant qu'à la pénicilline. Cette diversification de souches, simultanément présentes chez un même patient, est en accord avec des données de littérature qui relate une grande hétérogénéité phénotypique d'un même complexe clonal chez des patients atteints de mucoviscidose. Ces co-colonisations simultanées seraient même un stigmate d'infection chronique, par opposition à la simple colonisation, moins hétérogène phénotypiquement (Goerke et al., 2007).

L'étude de la dynamique de colonisation par *S. aureus* a donc été effectuée par le génotypage des isolats par la méthode du « *spa* typing ». Cette méthode de typage présente l'avantage d'être peu coûteuse, relativement aisée à réaliser en comparaison aux autres méthodes de typage, et présente surtout un bon pouvoir discriminant (Koreen et al., 2004; Schouls et al., 2009). Celui-ci se situe néanmoins en dessous des méthodes les plus discriminantes chez *S. aureus* (PFGE et surtout MLVA), mais celles-ci restent beaucoup plus lourdes. Le *spa* typing est donc une méthode fiable pour discriminer les souches de *S. aureus* entre elles.

Le typage du gène *spa* a ainsi été réalisé sur 164 isolats, isolés chez les 24 patients de cette étude, sur une période totale de 2 ans, entourant « l'évènement SAMR ».

Une grande variation du nombre d'isolats de *S. aureus* par patient a été répertoriée, allant de 3 à 20, en rapport avec leur éventuel statut de colonisé chronique. Une grande diversité de génotypes *spa* a été retrouvée, plus importante chez les SAMS que chez les SAMR, étant en cela similaire à celle

observée dans les quelques études effectuées à l'aide de cette méthode de typage (Grundmann et al., 2010; Rolo et al., 2012). Quarante-trois génotypes *spa* différents ont été individualisés parmi les 164 isolats : 35 *spa* types déjà répertoriés dans les bases de données internationales, ainsi que 8 autres *spa* types non répertoriés actuellement. La majorité des souches cependant (43%), qu'elles soient de phénotype SAMS ou SAMR, proviennent de 2 complexes clonaux de génotype *spa* reliés à t008 et à t002. Ces deux *spa* types sont prépondérants en Europe, et partagés entre les SAMS et les SAMR. Le *spa* type t002 est surtout l'apanage des SAMS, tandis que t008 est celui des SAMR (Grundmann et al., 2010). Ces génotypes ne sont pas spécifiques de la mucoviscidose. Par exemple, pour les SAMR, le « clone Lyon », prépondérant en France, est de *spa* type t008 (Dauwalder et al., 2008). Il ne semble pas globalement exister de lignée spécifique de la mucoviscidose (Vu-Thien et al., 2010).

Les patients colonisés simultanément par plusieurs souches (co-colonisation) sont fréquents : 7 patients sur les 24 présentent au moins 2 souches distinctes, et associent souvent SAMS et SAMR. Ceci a déjà été rapporté en dehors de la mucoviscidose (Mongkolrattanothai et al., 2011) et dans la mucoviscidose (Vu-Thien et al., 2010). Une telle diversité de souches pose ainsi le problème de sa détection bactériologique. La méthode de « l'antibiogramme » direct, utilisée au laboratoire du CHU de Rouen, ou l'utilisation de milieux sélectifs pour les SAMR (gélouses MRSA) (Perez et al., 2012) peuvent palier à cette difficulté et éviter la non détection d'une proportion importante de SAMR.

De plus, à l'intérieur d'un même complexe clonal, une diversité phénotypique importante des souches présentes chez un même patient au même moment, ajoute un degré supplémentaire de complexité. Cette diversification de souches à partir d'une même souche initiale a déjà été décrite dans la littérature (Goerke et al., 2007; Goerke and Wolz, 2010), et correspondrait à un processus d'adaptation dans un contexte d'infection chronique. Cette diversité phénotypique s'accompagne de différences de sensibilités aux antibiotiques, et serait même le signe d'un état d'infection plutôt que d'une simple colonisation, comme mentionné plus haut.

Le suivi longitudinal de la colonisation par SAMS révèle principalement la persistance chronique d'une même souche. Cette colonisation sous-jacente est fréquemment ponctuée d'autres SAMS de *spa* types différents, qui introduisent un risque de faux négatifs pour la souche chronique, lors des prélèvements intercurrents. Peu d'études sont actuellement disponibles pour pouvoir affirmer que la colonisation par *S. aureus* est principalement due à une souche persistante, mais certaines d'entre elles ont déjà retrouvé la même conclusion par d'autres méthodes de typage chez des patients atteints de mucoviscidose (Kahl et al., 2003; Vu-Thien et al., 2010). Ce type de colonisations persistantes par SAMS rend difficile l'attribution d'un rôle pathogène éventuel du SAMS dans les exacerbations. L'aspect quantitatif de SAMS, comme cela a été montré pour *P. aeruginosa* avec le déclenchement de l'expression de facteurs de virulence, via le *quorum sensing*, en présence de fortes concentrations de la bactérie, pourrait avoir un rôle dans les exacerbations (Hauser et al., 2011). De

même, le changement de souche de SAMS pourrait également représenter un facteur impliqué dans ces exacerbations ; ceci ayant déjà été évoqué pour *H. influenzae*. Un travail prospectif serait plus adapté pour évaluer ces possibles impacts sur la fonction respiratoire de ces patients ; le travail ici présent ne permettant pas d'étudier cela.

La transition SAMS/SAMR correspondait le plus souvent (78% des cas) à l'acquisition d'une nouvelle souche, et non à l'évolution du SAMS vers la résistance à l'oxacilline. En dehors de la mucoviscidose, il est relativement admis que l'apparition d'un SAMR chez un patient porteur au préalable d'un SAMS est surtout le fait de l'acquisition d'une nouvelle souche, portant la cassette de résistance contenant le gène *mecA* (Wielders et al., 2002). Bien sûr, l'origine de la résistance à la méthicilline chez *S. aureus* est bien le résultat d'un transfert horizontal du gène *mecA* chez des souches distinctes de SAMS, mais ces transferts de gène se font à l'échelle de l'évolution d'une espèce et sont donc relativement rares ; ce type de transfert du gène *mecA* a cependant été décrit chez un patient entre *S. epidermidis* et SAMS (Wielders et al., 2001).

De plus, une des cassettes SCC*mec*, de type IV, est la cassette la plus mobile (Baba et al., 2002; Cespedes et al., 2005) donc plus facilement transférable entre souches. Une des souches de SAMR majoritairement retrouvée dans ce travail est de *spa* type t008, qui correspondrait probablement à des types de souches contenant cette cassette SCC*mec* de type IV, appelé « clone Lyon », fréquentes en France.

Pourtant, malgré ces éléments, le mécanisme d'acquisition de SAMR ne semble pas ici correspondre à l'évolution vers la méthicillino-résistance d'un SAMS présent au préalable, sous l'effet des antibiothérapies, par acquisition du gène *mecA* ou par hyperproduction de pénicillinase (aucune souche BORSA n'a d'ailleurs été retrouvée).

La persistance de souche est retrouvée chez les SAMR, comme pour les SAMS, chez la majorité des 24 patients (73% des patients présentant une seule et même souche de SAMR), conformément à d'autres études sur l'épidémiologie des SAMR dans la mucoviscidose (Kidd, Coulter, and Bell, 2006; Vu-Thien et al., 2010).

L'origine de l'acquisition des SAMR reste incertaine et ne peut être affirmée sur nos seules données. Au niveau mondial, le principal réservoir de SAMR pourvoyeur d'infections, toutes populations confondues, est d'origine hospitalière. Bien que la prévalence des SAMR communautaires (SAMR-C) soit en augmentation, elle ne surpasse pas celle des souches hospitalières (Otter and French, 2010). Des études se penchent d'ailleurs spécifiquement sur le rôle de la transmission staphylococcique par l'environnement, ou au sein des familles (Davis 2012). La diffusion de ces SAMR-C est hétérogène à travers le monde, mais reste relativement faible en France (3,6%), au contraire de la situation aux Etats-Unis où cette proportion atteindrait 59% des *S. aureus* isolés d'infections de la peau ou des tissus mous (Dumitrescu et al., 2010). La distinction entre clones

d'origine communautaire et clones d'origine nosocomiale est habituellement faite sur la base de données de génotypage (MLST, *spa* typing, recherche du gène codant la LPV, et surtout typage de la cassette *mec*) et sur le profil de résistance aux antibiotiques. Le *spa* type t008 majoritairement retrouvé parmi les SAMR de notre étude, pourrait correspondre à un des clones de SAMR (le « clone Lyon »), sévissant en France, qui porte la cassette *SCCmec* IV, caractérisant initialement l'origine communautaire des SAMR. Or, ce type de *SCCmec* est depuis retrouvé également chez des SAMR d'origine hospitalière, comme c'est justement le cas de ce clone (Dauwalder et al., 2008; Dufour et al., 2002). De plus, les caractéristiques de la grande majorité des 77 SAMR de notre travail ressemblent plutôt à celles communément décrites pour les SAMR d'acquisition hospitalière (résistances multiples aux antibiotiques), mais nos données sont insuffisantes pour l'affirmer. Le typage de la cassette *SCCmec* ou le génotypage par MLST seraient utiles pour compléter cette description et préciser davantage l'origine communautaire ou nosocomiale des SAMR retrouvés dans ce travail.

Des SAMR et SAMS de même génotype ont été retrouvés chez des patients différents lors de cette étude. Dans le cas des génotypes t008 et t002, les plus largement distribués, cela ne signifie pas qu'il y a eu transmission croisée entre des patients. Cependant, trois autres *spa* types apparemment plus rares sont également partagés entre plusieurs patients. Les dates d'isolement de ces *spa* types ne correspondent pas toujours entre patients, mais ceci ne permet pas de conclure sur leur absence de transmission ; les dates des débuts de colonisations par ces souches étant inconnues à l'issue de ce travail. En outre, une méthode plus discriminante que le *spa* typing, comme la MLVA, est requise pour pouvoir affirmer que ces souches sont bien identiques.

Afin de mieux comprendre les circonstances de survenue des SAMR chez le patient atteint de mucoviscidose, une analyse des antibiothérapies reçues par le patient avant l'isolement du SAMR a été effectuée. L'ensemble des antibiothérapies a été répertorié sur une période de 6 mois précédant la primo- ou la recolonisation à SAMR. Cette période a été définie comme étant adéquate pour obtenir un recul suffisant, mais également assez courte ; les antibiothérapies administrées à trop long terme n'ayant pas un véritable impact sur l'émergence du SAMR.

La diversité des molécules répertoriées (28 molécules antibiotiques différentes prescrites sur les 6 mois) atteste de la grande imprégnation antibiotique des patients atteints de mucoviscidose. Les raisons en sont diverses, principalement dominées par la symptomatologie respiratoire, mais également par des prescriptions autres, parfois initiées par le médecin traitant. Certaines antibiothérapies signent de façon claire la prise en charge de certaines bactéries (*Pseudomonas aeruginosa* et la cure ceftazidime - tobramycine, *Haemophilus influenzae* et amoxicilline-acide clavulanique, SAMS et cotrimoxazole...).

Dans deux tiers des cas, des cures antibiotiques potentiellement sélectionnantes (inactives spécifiquement sur le SAMR isolé dans les suites de la cure) ont été retrouvées. La pression de

sélection antibiotique est bien décrite dans la littérature comme étant liée à l'acquisition de SAMR. Il a été montré que, à l'échelle individuelle, la consommation de certains antibiotiques pouvait représenter un facteur de risque. Les quinolones sont les plus fréquemment citées comme pourvoyeuses de cette acquisition (Charbonneau et al., 2005; Muller et al., 2003; Nadesalingam, Conway, and Denton, 2005). L'imprégnation antibiotique importante des patients atteints de mucoviscidose, notamment en termes d'antibiotiques sélectionnants, prépare le terrain de la persistance de souches de SAMR acquises. De plus, le terrain respiratoire des patients atteints de mucoviscidose, présentant de multiples biofilms, associé à l'état d'hyperviscosité de la muqueuse respiratoire, participe également à la mauvaise pénétration des antibiotiques, y compris ceux potentiellement actifs sur les SAMR.

Dans un tiers des cas, au moins 1 antibiotique actif sur le SAMR isolé a été retrouvé. Ces circonstances sont assez intrigantes, et permettent de supposer d'une part, que l'exposition à un réservoir de SAMR était trop éloignée de la fin de l'antibiothérapie active, ou d'autre part, que l'activité des antibiotiques observée *in vitro* n'était pas corrélée à celle constatée *in vivo*. Des problématiques pharmacocinétiques pourraient être à l'origine de cette incohérence, ainsi que la difficulté de pénétration de l'antibiotique actif au travers de ce mucus hypervisqueux et d'éventuels biofilms bactériens.

La prise en charge antibiotique de la colonisation par SAMR s'est avérée quasi-systématique (81% des cas).

Le traitement des SAMS est très controversé, mais celui des SAMR l'est beaucoup moins (Société Française de Pédiatrie and ANAES, 2002b). Bien que les glycopeptides soient très souvent utilisés dans les infections à SAMR en dehors de la mucoviscidose, ils sont très peu prescrits chez les patients atteints de mucoviscidose. Si ces antibiotiques venaient à être plus largement utilisés chez ces patients, une vigilance serait de mise, en raison de la description de souches de *S. aureus* de sensibilité intermédiaire aux glycopeptides (Filleron et al., 2011). De plus, ces souches ne sont pas détectées par les antibiogrammes classiques, et la sensibilité des glycopeptides pourrait ne pas être de 100%. Cependant, les antibiothérapies par voie orale sont bien plus souvent privilégiées dans la mucoviscidose, afin de ne pas encore alourdir la prise médicamenteuse déjà importante de ces patients. La rifampicine et l'acide fusidique en association, la pristinaamycine, le cotrimoxazole ou encore le linézolide ont été les principales molécules utilisées, et ce, en conformité globale avec les recommandations françaises (Société Française de Pédiatrie and ANAES, 2002b).

La majorité des SAMR de primo- ou recolonisation ont été éradiqués de façon totale (53%) ou transitoire (18%) par les cures antibiotiques administrées, mais 27% des souches se sont maintenues durablement malgré une antibiothérapie active *in vitro*. Selon les études, l'efficacité des antibiothérapies varie en fonction des protocoles utilisés (utilisation de la vancomycine, parfois sous forme nébulisée, du linézolide ou de l'association rifampicine – acide fusidique) et du profil des patients (patients nouvellement colonisés ou colonisés chroniques), mais est globalement bonne. Des

taux avoisinant les 70% à 80% d'éradication sont publiés (Doe et al., 2010; Ferrin et al., 2002; Garske et al., 2004; Macfarlane et al., 2007), avec une certaine efficacité de l'association rifampicine – acide fusidique, qui représente une des cures les plus utilisées dans ce travail. Une analyse plus fine de l'effet des antibiothérapies visant le SAMR, comprenant l'amélioration clinique non étudiée dans ce travail, pourrait préciser le niveau d'efficacité pour chaque patient spécifiquement, car, finalement, seuls 3 patient sur les 24 sont toujours colonisés chroniquement à SAMR en 2012. Il n'existe pas de consensus véritablement tranché pour le choix d'un protocole antibiotique en particulier, mais seulement des propositions de traitements, laissant une large place à l'appréciation du clinicien, confronté à une grande complexité de situations cliniques différente selon les patients.

VII. Conclusion et perspectives

La mucoviscidose est une pathologie véritablement complexe, notamment sur le plan des infections respiratoires, qui comptent beaucoup dans la gravité de la maladie. La dynamique de colonisation par *S. aureus* dans la mucoviscidose est un domaine encore peu connu, surtout pour ce qui concerne la colonisation à SAMS et la transition SAMS/SAMR, ce dernier compliquant encore un peu plus la prise en charge antibiotique de ces patients.

Ce travail s'est donc intéressé à cette dynamique de colonisation par *S. aureus*, et tout particulièrement à la transition SAMS/SAMR. Le positionnement initial du sujet, volontairement assez vaste, a permis d'obtenir une image globale de la diversité de la colonisation par *S. aureus* des patients suivis au CRCM de Rouen, et a fait ressortir plusieurs éléments : (1) des co-colonisations fréquentes (SAMS/SAMR de génotypes différents), ainsi qu'une diversité phénotypique de variants ayant divergé à partir d'une même souche initiale, (2) une colonisation chronique par SAMS très souvent liée à la persistance d'une même souche (avec parfois des isolats intercurrents supplémentaires), (3) une transition SAMS/SAMR presque toujours liée à l'acquisition d'une nouvelle souche (SAMR), (4) des clones de SAMR classiques, identiques à ceux qui prévalent en dehors de la mucoviscidose, (5) des clones de SAMR qui, après la colonisation initiale, ont tendance à persister (changements de génotypes rares), (6) une antibiothérapie potentiellement sélectionnante retrouvée seulement dans deux tiers des cas juste avant la colonisation par SAMR, et (7) des SAMR presque toujours pris en compte par un traitement antibiotique, mais qui ne sont durablement éradiqués que dans 53% des cas.

Quelques perspectives...

Si la colonisation chronique par SAMS est souvent (mais pas toujours) liée à la persistance d'un même génotype, comment préciser le rôle pathogène éventuel de *S. aureus* dans les exacerbations ? Un travail prospectif fondé sur le suivi des données cliniques relatives aux exacerbations aiguës, confronté à une quantification de *S. aureus* dans l'expectoration, associé à un génotypage systématique de la ou des souches de *S. aureus* isolées, permettrait peut-être de préciser si *S. aureus* peut exercer un rôle pathogène, en situation aiguë, uniquement par des aspects quantitatifs, ou si un changement de génotype colonisateur favorise l'exacerbation.

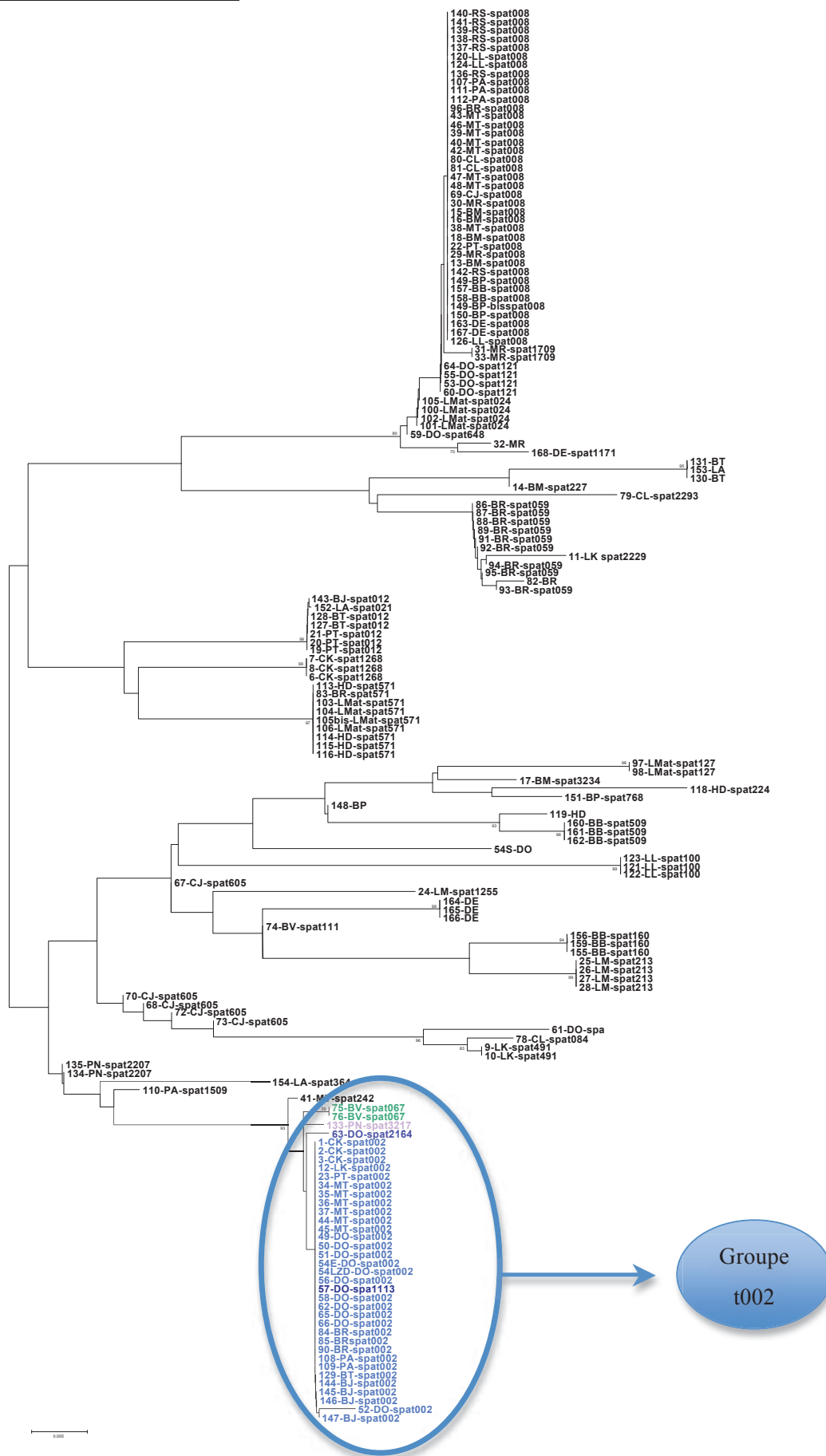
Si les co-colonisations par plusieurs souches différentes, ou variants différents d'une même souche, sont fréquentes, et probablement encore sous-estimées dans ce travail, il serait intéressant d'évaluer chez tous les colonisés chroniques par SAMS et/ou SAMR le niveau réel de diversité génétique et phénotypique des souches impliquées, par exemple par caractérisation, génotypage, et réalisation d'antibiogrammes sur tous les variants individualisables dans l'expectoration, une fois par

an ; la confrontation de ces données à celles issues du diagnostic microbiologique de routine pourrait avoir des conséquences à la fois diagnostiques et dans la prise en charge des patients.

Par ailleurs, il resterait aussi à compléter les données de génotypage obtenues à partir des souches de ce travail, pour, d'une part, essayer de préciser d'avantage l'origine de l'acquisition des SAMR retrouvés par les patients suivis à Rouen (MLST, typage de la cassette *mec*, recherche du gène codant la LPV), et, d'autre part, pour préciser ou infirmer les éventuelles transmissions croisées de souches entre patients (en utilisant une méthode comme la MLVA, plus discriminante que le *spa* typing).

Ce ne sont que quelques suggestions, réalisables à partir des données rouennaises, mais d'autres propositions sont sûrement à envisager pour poursuivre ce travail.

VIII. Annexe



IX. Bibliographie

- Ager, S., and Gould, K. (2012). Clinical update on linezolid in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Infect Drug Resist* 5, 87-102.
- Aires-de-Sousa, M., Boye, K., de Lencastre, H., Deplano, A., Enright, M. C., Etienne, J., Friedrich, A., Harmsen, D., Holmes, A., Huijsdens, X. W., Kearns, A. M., Mellmann, A., Meugnier, H., Rasheed, J. K., Spalburg, E., Strommenger, B., Struelens, M. J., Tenover, F. C., Thomas, J., Vogel, U., Westh, H., Xu, J., and Witte, W. (2006). High interlaboratory reproducibility of DNA sequence-based typing of bacteria in a multicenter study. *J Clin Microbiol* 44(2), 619-21.
- Andersen, D. H. (1949). The present diagnosis and therapy of cystic fibrosis of the pancreas. *Proc R Soc Med* 42(1), 25-32.
- Aris, R. M., Routh, J. C., LiPuma, J. J., Heath, D. G., and Gilligan, P. H. (2001). Lung transplantation for cystic fibrosis patients with *Burkholderia cepacia* complex. Survival linked to genomovar type. *Am J Respir Crit Care Med* 164(11), 2102-6.
- Armstrong, D. S., Hook, S. M., Jansen, K. M., Nixon, G. M., Carzino, R., Carlin, J. B., Robertson, C. F., and Grimwood, K. (2005). Lower airway inflammation in infants with cystic fibrosis detected by newborn screening. *Pediatr Pulmonol* 40(6), 500-10.
- Baba, T., Takeuchi, F., Kuroda, M., Yuzawa, H., Aoki, K., Oguchi, A., Nagai, Y., Iwama, N., Asano, K., Naimi, T., Kuroda, H., Cui, L., Yamamoto, K., and Hiramatsu, K. (2002). Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet* 359(9320), 1819-27.
- Bannerman, T. L., Hancock, G. A., Tenover, F. C., and Miller, J. M. (1995). Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 33(3), 551-5.
- Besier, S., Smaczny, C., von Mallinckrodt, C., Krahle, A., Ackermann, H., Brade, V., and Wichelhaus, T. A. (2007). Prevalence and clinical significance of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis lung disease. *J Clin Microbiol* 45(1), 168-72.
- Betton, D., Gairard-Dory, A. C., Kessler, R., Jehl, F., Rosner, V., Weitzenblum, E., and Beretz, L. (2006). [Use of linezolid for the treatment of lung infections in adults with cystic fibrosis]. *Rev Pneumol Clin* 62(6 Pt 1), 374-8.
- Bienvenu, T. (2003). [Cystic fibrosis: relationship between genotype and phenotype]. *Arch Pediatr* 10 Suppl 2, 318s-324s.
- Bonnet R., Caron F., Cavallo J.D., Chardon H., Chidiac C., Courvalin P., Drugeon H., Dubreuil L., Jarlier F., Jehl F., Lambert T., Leclercq R., Nicolas-Chanoine M.H., Plesiat P., Ploy M.C., Quentin C., Soussy C.J., Varon E., and P., W. (2012). Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2012. Société Française de Microbiologie.

- Boussaud, V., Guillemain, R., Grenet, D., Coley, N., Souilamas, R., Bonnette, P., and Stern, M. (2008). Clinical outcome following lung transplantation in patients with cystic fibrosis colonised with *Burkholderia cepacia* complex: results from two French centres. *Thorax* 63(8), 732-7.
- Bui, S., Boisserie-Lacroix, V., Ceccato, F., Clouzeau, H., Debeleix, S., and Fayon, M. (2012). [Pulmonary inflammation in cystic fibrosis]. *Arch Pediatr* 19 Suppl 1, S8-12.
- Campana, S., Taccetti, G., Ravenni, N., Masi, I., Audino, S., Sisi, B., Repetto, T., Doring, G., and de Martino, M. (2004). Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* complex and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a cystic fibrosis center. *J Cyst Fibros* 3(3), 159-63.
- Cardines, R., Giufre, M., Pompilio, A., Fiscarelli, E., Ricciotti, G., Bonaventura, G. D., and Cerquetti, M. (2012). *Haemophilus influenzae* in children with cystic fibrosis: antimicrobial susceptibility, molecular epidemiology, distribution of adhesins and biofilm formation. *Int J Med Microbiol* 302(1), 45-52.
- Cespedes, C., Said-Salim, B., Miller, M., Lo, S. H., Kreiswirth, B. N., Gordon, R. J., Vavagiakis, P., Klein, R. S., and Lowy, F. D. (2005). The clonality of *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *J Infect Dis* 191(3), 444-52.
- Charbonneau, P., Parienti, J. J., Thibon, P., Lebouvier, G., and Leclercq, R. (2005). [Fluoroquinolone use and MRSA rates in hospitalized patients]. *Med Mal Infect* 35 Suppl 2, S35-7.
- Christian, N. (2009). Première observation française de la Maladie Fibrokystique du Pancréas (Mucoviscidose). *La Revue du Praticien* 59, 733-737.
- Cocchi, P., Cariani, L., Favari, F., Lambiase, A., Fiscarelli, E., Gioffre, F. V., d'Aprile, A., Manso, E., Taccetti, G., Braggion, C., Doring, G., de Martino, M., and Campana, S. (2011). Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Italian cystic fibrosis patients: a national overview. *J Cyst Fibros* 10(6), 407-11.
- Coolen-Allou, N., and Burgel, P. R. (2012). Mycobactéries non tuberculeuses et mucoviscidose. *Journal des Anti-infectieux Elsevier Masson SAS* 14(1), 35-41.
- Corvol, H., Flamant, C., Vallet, C., Clement, A., and Brouard, J. (2006). [Modifier genes and cystic fibrosis]. *Arch Pediatr* 13(1), 57-63.
- Courvalin, P., Leclerc, R., and Bingen, E. (2006). AntibioGramme. 2 ed (ESKA, Ed.), pp. 117-124, Paris, France.
- Cystic Fibrosis Foundation (2010). Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry - 2010 Annual Dat Report. Cystic Fibrosis Foundation.
- Dasenbrook, E. C., Merlo, C. A., Diener-West, M., Lechtzin, N., and Boyle, M. P. (2008). Persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and rate of FEV1 decline in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 178(8), 814-21.
- Daurel, C., and Leclerc, R. (2008). L'antibiogramme de *Staphylococcus aureus*. *Revue Francophone des Laboratoires Elsevier Masson SAS* 2008(407), 81-90.

- Dauwalder, O., Lina, G., Durand, G., Bes, M., Meugnier, H., Jarlier, V., Coignard, B., Vandenesch, F., Etienne, J., and Laurent, F. (2008). Epidemiology of invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones collected in France in 2006 and 2007. *J Clin Microbiol* 46(10), 3454-8.
- David, M. Z., and Daum, R. S. (2010). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clin Microbiol Rev* 23(3), 616-87.
- David, V. (2003). [How should initial colonization by *Pseudomonas aeruginosa* be treated in patients with cystic fibrosis?]. *Rev Mal Respir* 20(2 Pt 2), S113-7.
- Davis, P. B., Yasothan, U., and Kirkpatrick, P. (2012). Ivacaftor. *Nat Rev Drug Discov* 11(5), 349-50.
- De Vrankrijker, A. M., Wolfs, T. F., and van der Ent, C. K. (2010). Challenging and emerging pathogens in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* 11(4), 246-54.
- Deneuve, E., Beucher, J., and Roussey, M. (2007). Les manifestations respiratoires dans la mucoviscidose *Revue Francophone des Laboratoires Elsevier Masson SAS* 397, 6.
- Deschaght, P., Van Daele, S., De Baets, F., and Vaneechoutte, M. (2011). PCR and the detection of *Pseudomonas aeruginosa* in respiratory samples of CF patients. A literature review. *J Cyst Fibros* 10(5), 293-7.
- Deurenberg, R. H., and Stobberingh, E. E. (2008). The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol* 8(6), 747-63.
- Deurenberg, R. H., Vink, C., Kalenic, S., Friedrich, A. W., Bruggeman, C. A., and Stobberingh, E. E. (2007). The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 13(3), 222-35.
- Doe, S. J., McSorley, A., Isalska, B., Kearns, A. M., Bright-Thomas, R., Brennan, A. L., Webb, A. K., and Jones, A. M. (2010). Patient segregation and aggressive antibiotic eradication therapy can control methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at large cystic fibrosis centres. *J Cyst Fibros* 9(2), 104-9.
- Doring, G., Conway, S. P., Heijerman, H. G., Hodson, M. E., Hoiby, N., Smyth, A., and Touw, D. J. (2000). Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. *Eur Respir J* 16(4), 749-67.
- Doring, G., and Hoiby, N. (2004). Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis: a European consensus. *J Cyst Fibros* 3(2), 67-91.
- Dufour, P., Gillet, Y., Bes, M., Lina, G., Vandenesch, F., Floret, D., Etienne, J., and Richet, H. (2002). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Pantone-Valentine leukocidin. *Clin Infect Dis* 35(7), 819-24.
- Dumitrescu, O., Dauwalder, O., Boisset, S., Reverdy, M. E., Tristan, A., and Vandenesch, F. (2010). [*Staphylococcus aureus* resistance to antibiotics: key points in 2010]. *Med Sci (Paris)* 26(11), 943-9.

- Durieu, I., and Josserand, R. N. (2008). [Cystic fibrosis in 2008]. *Rev Med Interne* 29(11), 901-7.
- Dutronic, H., Bocquentin, F., Galperine, T., Lafarie-Castet, S., and Dupon, M. (2005). [Linezolid, the first oxazolidinone antibiotic]. *Med Mal Infect* 35(9), 427-34.
- Elizur, A., Orscheln, R. C., Ferkol, T. W., Atkinson, J. J., Dunne, W. M., Jr., Buller, R. S., Armstrong, J. R., Mardis, E. R., Storch, G. A., and Cannon, C. L. (2007). Pantone-Valentine Leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lung infection in patients with cystic fibrosis. *Chest* 131(6), 1718-25.
- Emerson, J., McNamara, S., Buccat, A. M., Worrell, K., and Burns, J. L. (2010). Changes in cystic fibrosis sputum microbiology in the United States between 1995 and 2008. *Pediatr Pulmonol* 45(4), 363-70.
- Endimiani, A., Blackford, M., Dasenbrook, E. C., Reed, M. D., Bajaksouszian, S., Hujer, A. M., Rudin, S. D., Hujer, K. M., Perreten, V., Rice, L. B., Jacobs, M. R., Konstan, M. W., and Bonomo, R. A. (2011). Emergence of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* after prolonged treatment of cystic fibrosis patients in Cleveland, Ohio. *Antimicrob Agents Chemother* 55(4), 1684-92.
- Enright, M. C., Day, N. P., Davies, C. E., Peacock, S. J., and Spratt, B. G. (2000). Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 38(3), 1008-15.
- Equi, A., Balfour-Lynn, I. M., Bush, A., and Rosenthal, M. (2002). Long term azithromycin in children with cystic fibrosis: a randomised, placebo-controlled crossover trial. *Lancet* 360(9338), 978-84.
- Farrell, P. M., Rosenstein, B. J., White, T. B., Accurso, F. J., Castellani, C., Cutting, G. R., Durie, P. R., Legrys, V. A., Massie, J., Parad, R. B., Rock, M. J., and Campbell, P. W., 3rd (2008). Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr* 153(2), S4-S14.
- Férec, C., and Scotet, V. (2012). Mucoviscidose et conseil génétique. *Pneumologie Elsevier Masson SAS* 9(3), 8.
- Ferrin, M., Zuckerman, J. B., Meagher, A., and Blumberg, E. A. (2002). Successful treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pulmonary infection with linezolid in a patient with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 33(3), 221-3.
- Filleron, A., Chiron, R., Reverdy, M. E., Jean-Pierre, H., Dumitrescu, O., Aleyrangues, L., Counil, F., Jumas-Bilak, E., and Marchandin, H. (2011). *Staphylococcus aureus* with decreased susceptibility to glycopeptides in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros* 10(5), 377-82.
- Finney, M. (2001). Pulsed-field gel electrophoresis. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 2, Unit2 5B.
- Frenay, H. M., Bunschoten, A. E., Schouls, L. M., van Leeuwen, W. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M., Verhoef, J., and Mooi, F. R. (1996). Molecular typing of methicillin-

- resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 15(1), 60-4.
- Freney, J., Renaud, F., Hansen, W., and Bollet, C. (2000). *Staphylococcus*. In "Précis de Bactériologie Clinique" (ESKA, Ed.), pp. 783-830, Paris, France.
- Fuchs, H. J., Borowitz, D. S., Christiansen, D. H., Morris, E. M., Nash, M. L., Ramsey, B. W., Rosenstein, B. J., Smith, A. L., and Wohl, M. E. (1994). Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. The Pulmozyme Study Group. *N Engl J Med* 331(10), 637-42.
- Garske, L. A., Kidd, T. J., Gan, R., Bunting, J. P., Franks, C. A., Coulter, C., Masel, P. J., and Bell, S. C. (2004). Rifampicin and sodium fusidate reduces the frequency of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolation in adults with cystic fibrosis and chronic MRSA infection. *J Hosp Infect* 56(3), 208-14.
- Givney, R., Vickery, A., Holliday, A., Pegler, M., and Benn, R. (1997). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a cystic fibrosis unit. *J Hosp Infect* 35(1), 27-36.
- Glikman, D., Siegel, J. D., David, M. Z., Okoro, N. M., Boyle-Vavra, S., Dowell, M. L., and Daum, R. S. (2008). Complex molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from children with cystic fibrosis in the era of epidemic community-associated methicillin-resistant *S. aureus*. *Chest* 133(6), 1381-7.
- Goerke, C., Gressinger, M., Endler, K., Breitkopf, C., Wardecki, K., Stern, M., Wolz, C., and Kahl, B. C. (2007). High phenotypic diversity in infecting but not in colonizing *Staphylococcus aureus* populations. *Environ Microbiol* 9(12), 3134-42.
- Goerke, C., Kraning, K., Stern, M., Doring, G., Botzenhart, K., and Wolz, C. (2000). Molecular epidemiology of community-acquired *Staphylococcus aureus* in families with and without cystic fibrosis patients. *J Infect Dis* 181(3), 984-9.
- Goerke, C., and Wolz, C. (2010). Adaptation of *Staphylococcus aureus* to the cystic fibrosis lung. *Int J Med Microbiol* 300(8), 520-5.
- Goss, C. H., and Muhlebach, M. S. (2011). Review: *Staphylococcus aureus* and MRSA in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 10(5), 298-306.
- Groupe Rémic de la Société Française de Microbiologie (2010). Diagnostic microbiologique des sécrétions broncho-pulmonaires chez un patient mucoviscidose. 4 ed. In "Rémic - Référentiel en microbiologie médicale" (SFM, Ed.), pp. 99-103, Paris.
- Grundmann, H., Aanensen, D. M., van den Wijngaard, C. C., Spratt, B. G., Harmsen, D., and Friedrich, A. W. (2010). Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis. *PLoS Med* 7(1), e1000215.
- Harmsen, D., Claus, H., Witte, W., Rothganger, J., Turnwald, D., and Vogel, U. (2003). Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. *J Clin Microbiol* 41(12), 5442-8.

- HAS (2009). Le dépistage néonatal systématique de la Mucoviscidose en France : état des lieux et perspectives après 5 ans de fonctionnement. HAS. Janvier 2009.
- Hauser, A. R., Jain, M., Bar-Meir, M., and McColley, S. A. (2011). Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 24(1), 29-70.
- Huang, N. N., Schidlow, D. V., Szatrowski, T. H., Palmer, J., Laraya-Cuasay, L. R., Yeung, W., Hardy, K., Quitell, L., and Fiel, S. (1987). Clinical features, survival rate, and prognostic factors in young adults with cystic fibrosis. *Am J Med* 82(5), 871-9.
- Hubert, D. (2008). Mucoviscidose de l'adulte. *EMC Pneumologie Elsevier Masson SAS* 6-031-A-20, 11.
- Hudson, V. L., Wielinski, C. L., and Regelman, W. E. (1993). Prognostic implications of initial oropharyngeal bacterial flora in patients with cystic fibrosis diagnosed before the age of two years. *J Pediatr* 122(6), 854-60.
- International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC) (2009). Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Antimicrob Agents Chemother* 53(12), 4961-7.
- Kahl, B. C. (2010). Impact of Staphylococcus aureus on the pathogenesis of chronic cystic fibrosis lung disease. *Int J Med Microbiol* 300(8), 514-9.
- Kahl, B. C., Duebbers, A., Lubritz, G., Haeberle, J., Koch, H. G., Ritzerfeld, B., Reilly, M., Harms, E., Proctor, R. A., Hermann, M., and Peters, G. (2003). Population dynamics of persistent Staphylococcus aureus isolated from the airways of cystic fibrosis patients during a 6-year prospective study. *J Clin Microbiol* 41(9), 4424-7.
- Kahl, B. C., Mellmann, A., Deiwick, S., Peters, G., and Harmsen, D. (2005). Variation of the polymorphic region X of the protein A gene during persistent airway infection of cystic fibrosis patients reflects two independent mechanisms of genetic change in Staphylococcus aureus. *J Clin Microbiol* 43(1), 502-5.
- Kerem, E., Corey, M., Kerem, B. S., Rommens, J., Markiewicz, D., Levison, H., Tsui, L. C., and Durie, P. (1990). The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis--analysis of the most common mutation (delta F508). *N Engl J Med* 323(22), 1517-22.
- Kidd, T. J., Coulter, C., and Bell, S. C. (2006). Epidemiological analysis of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates from adult patients with cystic fibrosis. *Infect Control Hosp Epidemiol* 27(2), 201-3.
- Konstan, M. W., and Berger, M. (1997). Current understanding of the inflammatory process in cystic fibrosis: onset and etiology. *Pediatr Pulmonol* 24(2), 137-42; discussion 159-61.
- Koreen, L., Ramaswamy, S. V., Graviss, E. A., Naidich, S., Musser, J. M., and Kreiswirth, B. N. (2004). spa typing method for discriminating among Staphylococcus aureus isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation. *J Clin Microbiol* 42(2), 792-9.

- Kuhn, G., Francioli, P., and Blanc, D. S. (2007). Double-locus sequence typing using *clfB* and *spa*, a fast and simple method for epidemiological typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 45(1), 54-62.
- Laurent, F., Chardon, H., Haenni, M., Bes, M., Reverdy, M. E., Madec, J. Y., Lagier, E., Vandenesch, F., and Tristan, A. (2012). MRSA Harboring *mecA* Variant Gene *mecC*, France. *Emerg Infect Dis* 18(9), 1465-7.
- Le Bourgeois, M., Sermet-Gaudelus, I., Catherinot, E., and Gaillard, J. L. (2005). [Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis]. *Arch Pediatr* 12 Suppl 2, S117-21.
- Le Bourgeois, M., Sermet, I., Bailly-Botuha, C., Delacourt, C., and de Blic, J. (2011). [Fungal infections in cystic fibrosis]. *Arch Pediatr* 18 Suppl 1, S15-21.
- Leahy, T. R., Yau, Y. C., Atenafu, E., Corey, M., Ratjen, F., and Waters, V. (2011). Epidemiology of borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Pediatric Cystic Fibrosis. *Pediatr Pulmonol*.
- Lemée L, Michon A.-L, Duet E, Pestel-Caron M, Pons J.-L, and J.-F, L. (2004). Intérêt potentiel de la réalisation d'un antibiogramme directement à partir du sputum de patients mucoviscidosiques pour la détection et la caractérisation de bacilles Gram négatifs multirésistants., Sixième Congrès National de la Société Française de Microbiologie, Bordeaux.
- Lenoir, G., Vrielynck, S., Clairicia, M., Afsa Fezaa, D., Sorin, M., and Sermet-Gaudelus, I. (2007). Infection bactérienne et mucoviscidose. *Revue Francophone des Laboratoires Elsevier Masson SAS*(397), 49-57.
- LiPuma, J. J. (2001). *Burkholderia cepacia* complex: a contraindication to lung transplantation in cystic fibrosis? *Transpl Infect Dis* 3(3), 149-60.
- Looney, W. J., Narita, M., and Muhlemann, K. (2009). *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen. *Lancet Infect Dis* 9(5), 312-23.
- Lubamba, B., Dhooghe, B., Noel, S., and Leal, T. (2012). Cystic fibrosis: Insight into CFTR pathophysiology and pharmacotherapy. *Clin Biochem*.
- Macfarlane, M., Leavy, A., McCaughan, J., Fair, R., and Reid, A. J. (2007). Successful decolonization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in paediatric patients with cystic fibrosis (CF) using a three-step protocol. *J Hosp Infect* 65(3), 231-6.
- Maiden, M. C., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D. A., Feavers, I. M., Achtman, M., and Spratt, B. G. (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(6), 3140-5.
- Malachowa, N., Sabat, A., Gniadkowski, M., Krzyszton-Russjan, J., Empel, J., Miedzobrodzki, J., Kosowska-Shick, K., Appelbaum, P. C., and Hryniewicz, W. (2005). Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis with pulsed-field gel electrophoresis, *spa* typing, and multilocus sequence typing for clonal characterization of *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol* 43(7), 3095-100.

- Mariani-Kurkdjian, P., and Bingen, E. (2003). [Pathogenic bacteria in cystic fibrosis]. *Arch Pediatr* 10 Suppl 2, 342s-346s.
- Matsui, H., Grubb, B. R., Tarran, R., Randell, S. H., Gatzky, J. T., Davis, C. W., and Boucher, R. C. (1998). Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell* 95(7), 1005-15.
- Mayaud, C. (2007). [Pseudomonas and bronchial diseases]. *Med Mal Infect* 37(6), 300-4.
- Meghdas, I., Loiez, C., Baida, N., Dabboussi, F., Hamze, M., Husson, M. O., and Izard, D. (2004). [Epidemiology of infections associated to "Burkholderia cepacia complex" in the course of cystic fibrosis]. *Arch Pediatr* 11(4), 360-6.
- Mehta, A. (2005). CFTR: more than just a chloride channel. *Pediatr Pulmonol* 39(4), 292-8.
- Ministère de la solidarité et de l'emploi, and Direction de l'hospitalisation et de l'organisation des soins (2001). CIRCULAIRE N° DHOS/O1/DGS/SD5/2001/502 du 22 octobre 2001 relative à l'organisation des soins pour la prise en charge des patients atteints de mucoviscidose, circulaire.legifrance.gouv.fr/pdf/2009/04/cir_18582.pdf.
- Molina, A., Del Campo, R., Maiz, L., Morosini, M. I., Lamas, A., Baquero, F., and Canton, R. (2008). High prevalence in cystic fibrosis patients of multiresistant hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST228-SCCmecI capable of biofilm formation. *J Antimicrob Chemother* 62(5), 961-7.
- Mongkolrattanothai, K., Gray, B. M., Mankin, P., Stanfill, A. B., Pearl, R. H., Wallace, L. J., and Vegunta, R. K. (2011). Simultaneous carriage of multiple genotypes of *Staphylococcus aureus* in children. *J Med Microbiol* 60(Pt 3), 317-22.
- Mouterde, O. (2007). Manifestations digestives et nutritionnelles de la mucoviscidose. *Revue Francophone des Laboratoires* 397, 43-47.
- Muller, A., Thouverez, M., Talon, D., and Bertrand, X. (2003). [Contribution of antibiotic pressure in the acquisition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a university hospital]. *Pathol Biol (Paris)* 51(8-9), 454-9.
- Nadesalingam, K., Conway, S. P., and Denton, M. (2005). Risk factors for acquisition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 4(1), 49-52.
- Rapport d'activité 2008 / Annual Report 2008. Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques ONERBA. ISBN 978-2-916641-49-2 www.onerba.org.
- Orphanet (2012). Prévalence des maladies rares: Données bibliographiques. In "Série *Maladies rares*" (L. C. d'Orphanet, Ed.), Vol. Numéro 1 : Classement par ordre alphabétique des maladies ou groupes de maladies, pp. 30, <http://www.orpha.net>.
- Otter, J. A., and French, G. L. (2010). Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Lancet Infect Dis* 10(4), 227-39.

- Pedersen, S. S., Hoiby, N., Espersen, F., and Koch, C. (1992). Role of alginate in infection with mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Thorax* 47(1), 6-13.
- Pelluau, S., Oualha, M., Souilamas, R., and Hubert, P. H. (2012). [Respiratory failure in cystic fibrosis: management in pediatric intensive care unit, lung transplantation recommendation]. *Arch Pediatr* 19 Suppl 1, S40-3.
- Perez, L. R., Antunes, A. L., Bonfanti, J. W., Pinto, J. B., Roesch, E. W., Rodrigues, D., and Dias, C. A. (2012). Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in clinical specimens from cystic fibrosis patients by use of chromogenic selective agar. *J Clin Microbiol* 50(7), 2506-8.
- Pier, G. B. (2000). Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in innate immunity to *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(16), 8822-8.
- Pier, G. B., Grout, M., Zaidi, T. S., Olsen, J. C., Johnson, L. G., Yankaskas, J. R., and Goldberg, J. B. (1996). Role of mutant CFTR in hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections. *Science* 271(5245), 64-7.
- Prunier, A. L., Malbruny, B., Laurans, M., Brouard, J., Duhamel, J. F., and Leclercq, R. (2003). High rate of macrolide resistance in *Staphylococcus aureus* strains from patients with cystic fibrosis reveals high proportions of hypermutable strains. *J Infect Dis* 187(11), 1709-16.
- Ranganathan, S. C., Parsons, F., Gangell, C., Brennan, S., Stick, S. M., and Sly, P. D. (2011). Evolution of pulmonary inflammation and nutritional status in infants and young children with cystic fibrosis. *Thorax* 66(5), 408-13.
- Ratjen, F., Comes, G., Paul, K., Posselt, H. G., Wagner, T. O., and Harms, K. (2001). Effect of continuous antistaphylococcal therapy on the rate of *P. aeruginosa* acquisition in patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 31(1), 13-6.
- Ratjen, F., and Doring, G. (2003). Cystic fibrosis. *Lancet* 361(9358), 681-9.
- Ravilly Sophie, L. R. E., Bellis Gil, Dufour Franck (2007). Epidémiologie et physiopathologie de la mucoviscidose. *Revue Francophone des Laboratoires Elsevier Masson SAS* 397, 12.
- Rayner, R. J., Hiller, E. J., Ispahani, P., and Baker, M. (1990). Haemophilus infection in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 65(3), 255-8.
- Ren, C. L., Morgan, W. J., Konstan, M. W., Schechter, M. S., Wagener, J. S., Fisher, K. A., and Regelman, W. E. (2007). Presence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in respiratory cultures from cystic fibrosis patients is associated with lower lung function. *Pediatr Pulmonol* 42(6), 513-8.
- Reverdy M.-E, Meugnier H, Bes M, Ferry T, Forey F, Lina G, Vandenesch F, and J, E. (2005). Epidémiologie des Sarm en France. Résistance aux antibiotiques et infections nosocomiales, Surveillance nationale des maladies infectieuses, 2001-2003 ed (Centre national de référence des staphylocoques, Inserm E0230, Faculté de médecine Laennec, and Laboratoire central de microbiologie, Eds.).

- Reychler G., and C., O. (2009). Kinésithérapie et mucoviscidose. 2 ed. In "Kinésithérapie respiratoire" (D. Bobu, Ed.). Elsevier Masson.
- Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J. L., and et al. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245(4922), 1066-73.
- Rolo, J., Miragaia, M., Turlej-Rogacka, A., Empel, J., Bouchami, O., Faria, N. A., Tavares, A., Hryniewicz, W., Fluit, A. C., and de Lencastre, H. (2012). High genetic diversity among community-associated *Staphylococcus aureus* in Europe: results from a multicenter study. *PLoS One* 7(4), e34768.
- Rosenfeld, M., Emerson, J., Accurso, F., Armstrong, D., Castile, R., Grimwood, K., Hiatt, P., McCoy, K., McNamara, S., Ramsey, B., and Wagener, J. (1999). Diagnostic accuracy of oropharyngeal cultures in infants and young children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 28(5), 321-8.
- Rosenfeld, M., Gibson, R. L., McNamara, S., Emerson, J., Burns, J. L., Castile, R., Hiatt, P., McCoy, K., Wilson, C. B., Inglis, A., Smith, A., Martin, T. R., and Ramsey, B. W. (2001). Early pulmonary infection, inflammation, and clinical outcomes in infants with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 32(5), 356-66.
- Roux, A. L., Herrmann, J. L., Gaillard, J. L., and Rottman, M. (2010). Mycobacterium abscessus, pathogène émergent dans la mucoviscidose. *Immunoanalyse et Biologie Spécialisée* 25(1), 26-33.
- Sabat, A., Krzyszton-Russjan, J., Strzalka, W., Filipek, R., Kosowska, K., Hryniewicz, W., Travis, J., and Potempa, J. (2003). New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. *J Clin Microbiol* 41(4), 1801-4.
- Sagel, S. D., Gibson, R. L., Emerson, J., McNamara, S., Burns, J. L., Wagener, J. S., and Ramsey, B. W. (2009). Impact of *Pseudomonas* and *Staphylococcus* infection on inflammation and clinical status in young children with cystic fibrosis. *J Pediatr* 154(2), 183-8.
- Saiman, L., Chen, Y., Tabibi, S., San Gabriel, P., Zhou, J., Liu, Z., Lai, L., and Whittier, S. (2001). Identification and antimicrobial susceptibility of *Alcaligenes xylosoxidans* isolated from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 39(11), 3942-5.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12), 5463-7.
- Santos, R. P., Prestidge, C. B., Brown, M. E., Urbanczyk, B., Murphey, D. K., Salvatore, C. M., Jafri, H. S., McCracken, G. H., Jr., Ahmad, N., Sanchez, P. J., and Siegel, J. D. (2009). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of linezolid in children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 44(2), 148-54.
- Schneider, M., Muhlemann, K., Droz, S., Couzinet, S., Casaulta, C., and Zimmerli, S. (2008). Clinical characteristics associated with isolation of small-colony variants of

- Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 46(5), 1832-4.
- Schouls, L. M., Spalburg, E. C., van Luit, M., Huijsdens, X. W., Pluister, G. N., van Santen-Verheuvél, M. G., van der Heide, H. G., Grundmann, H., Heck, M. E., and de Neeling, A. J. (2009). Multiple-locus variable number tandem repeat analysis of *Staphylococcus aureus*: comparison with pulsed-field gel electrophoresis and spa-typing. *PLoS One* 4(4), e5082.
- Segonds, C., Monteil, H., and Chabanon, G. (2006). Espèces du complexe *Burkholderia cepacia* : épidémiologie, pathogénicité et résistance aux antibiotiques. *Antibiotiques* 8(1), 43-50.
- Sermet-Gaudelus, I., Hulin, A., Ferroni, A., Silly, C., Gaillard, J. L., Berche, P., and Lenoir, G. (2000). L'antibiothérapie dans la mucoviscidose. I. Particularités pharmacologiques des antibiotiques. *Archives de Pédiatrie* 7(5), 519-528.
- Shopsin, B., Gomez, M., Montgomery, S. O., Smith, D. H., Waddington, M., Dodge, D. E., Bost, D. A., Riehman, M., Naidich, S., and Kreiswirth, B. N. (1999). Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* 37(11), 3556-63.
- Smyth, A. (2005). Prophylactic antibiotics in cystic fibrosis: a conviction without evidence? *Pediatr Pulmonol* 40(6), 471-6.
- Smyth, A., and Walter, S. (2010). Prophylactic anti-staphylococcal antibiotics for cystic fibrosis (Review). *Cochrane Database of Systematic Reviews*(11).
- Société Française de Pédiatrie, and ANAES (2002a). Conférence de consensus - Prise en charge du patient atteint de mucoviscidose - Observance, nutrition, gastro-entérologie et métabolisme, <http://www.has-sante.fr>.
- Société Française de Pédiatrie, and ANAES (2002b). Conférence de consensus. Prise en charge du patient atteint de mucoviscidose - Pneumologie et infectiologie, <http://www.has-sante.fr>.
- Spino, M. (1991). Pharmacokinetics of drugs in cystic fibrosis. *Clin Rev Allergy* 9(1-2), 169-210.
- Strommenger, B., Bräulke, C., Heuck, D., Schmidt, C., Pasemann, B., Nubel, U., and Witte, W. (2008). spa Typing of *Staphylococcus aureus* as a frontline tool in epidemiological typing. *J Clin Microbiol* 46(2), 574-81.
- Strommenger, B., Kettlitz, C., Weniger, T., Harmsen, D., Friedrich, A. W., and Witte, W. (2006). Assignment of *Staphylococcus* isolates to groups by spa typing, SmaI macrorestriction analysis, and multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 44(7), 2533-40.
- Stutman, H. R., Lieberman, J. M., Nussbaum, E., and Marks, M. I. (2002). Antibiotic prophylaxis in infants and young children with cystic fibrosis: a randomized controlled trial. *J Pediatr* 140(3), 299-305.

- Talmaciu, I., Varlotta, L., Mortensen, J., and Schidlow, D. V. (2000). Risk factors for emergence of *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 30(1), 10-5.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24(8), 1596-9.
- Tan, K., Conway, S. P., Brownlee, K. G., Etherington, C., and Peckham, D. G. (2002). *Alcaligenes* infection in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 34(2), 101-4.
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., and Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33(9), 2233-9.
- Tenover, F. C., Gay, E. A., Frye, S., Eells, S. J., Healy, M., and McGowan, J. E., Jr. (2009). Comparison of typing results obtained for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates with the DiversiLab system and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 47(8), 2452-7.
- Cystic Fibrosis Trust (2009). Antibiotic treatment for Cystic Fibrosis. UK Cystic Fibrosis Trust Antibiotic Working Group. May 2009.
- Vaincre La Mucoviscidose (2007). Registre français de la mucoviscidose 2007. In "Données spécifiques au Centres 14/85 Rouen Pédiatrie et Adultes Inter-Région Nord-Ouest".
- Vaincre La Mucoviscidose (2008). Registre français de la mucoviscidose 2008. In "Données spécifiques au Centres 14/85 Rouen Pédiatrie et Adultes Inter-Région Nord-Ouest".
- Vaincre La Mucoviscidose (2009). Registre français de la mucoviscidose 2009. In "Données spécifiques au Centres 14/85 Rouen Pédiatrie et Adultes Inter-Région Nord-Ouest".
- Vaincre la Mucoviscidose (2010). Registre français de la mucoviscidose. In "Données spécifiques au Centres 14/85 Rouen Pédiatrie et Adultes Inter-Région Nord-Ouest".
- Vaincre la Mucoviscidose, and Ined (2010a). Registre français de la mucoviscidose 2010. In "Données spécifiques au Centres 14/85 Rouen Pédiatrie et Adultes Inter-Région Nord-Ouest".
- Vaincre la Mucoviscidose, and Ined (2010b). Registre Français de la Mucoviscidose - Bilan des données 2010, pp. 44, <http://www.vaincrelamuco.org>.
- Van Ewijk, B. E., Van der Zalm, M. M., Wolfs, T. F., and Van der Ent, C. K. (2005). Viral respiratory infections in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 4 Suppl 2, 31-6.
- Vanderhelst, E., De Meirleir, L., Verbanck, S., Pierard, D., Vincken, W., and Malfroot, A. (2012). Prevalence and impact on FEV(1) decline of chronic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) colonization in patients with cystic fibrosis. A single-center, case control study of 165 patients. *J Cyst Fibros* 11(1), 2-7.

- Von Eiff, C., Peters, G., and Becker, K. (2006). The small colony variant (SCV) concept -- the role of staphylococcal SCVs in persistent infections. *Injury* 37 Suppl 2, S26-33.
- Vu-Thien, H., Hormigos, K., Corbineau, G., Fauroux, B., Corvol, H., Moissenet, D., Vergnaud, G., and Pourcel, C. (2010). Longitudinal survey of *Staphylococcus aureus* in cystic fibrosis patients using a multiple-locus variable-number of tandem-repeats analysis method. *BMC Microbiol* 10, 24.
- Waters, V., Atenafu, E. G., Salazar, J. G., Lu, A., Yau, Y., Matukas, L., Tullis, E., and Ratjen, F. (2012). Chronic *Stenotrophomonas maltophilia* infection and exacerbation outcomes in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 11(1), 8-13.
- Watson, M. E., Jr., Burns, J. L., and Smith, A. L. (2004). Hypermutable *Haemophilus influenzae* with mutations in *mutS* are found in cystic fibrosis sputum. *Microbiology* 150(Pt 9), 2947-58.
- Wielders, C. L., Fluit, A. C., Brisse, S., Verhoef, J., and Schmitz, F. J. (2002). *mecA* gene is widely disseminated in *Staphylococcus aureus* population. *J Clin Microbiol* 40(11), 3970-5.
- Wielders, C. L., Vriens, M. R., Brisse, S., de Graaf-Miltenburg, L. A., Troelstra, A., Flier, A., Schmitz, F. J., Verhoef, J., and Fluit, A. C. (2001). In-vivo transfer of *mecA* DNA to *Staphylococcus aureus* [corrected]. *Lancet* 357(9269), 1674-5.
- Yagci, S., Hascelik, G., Dogru, D., Ozcelik, U., and Sener, B. (2011). Prevalence and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect.*
- Yankaskas, J. R., Marshall, B. C., Sufian, B., Simon, R. H., and Rodman, D. (2004). Cystic fibrosis adult care: consensus conference report. *Chest* 125(1 Suppl), 1S-39S.

Liste des principales abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

ATP : Adénosine Triphosphate

CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CRCM : Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose

CVF : Capacité Vitale Forcée

DDP : Différence De Potentiel

ECBC : Examen CytoBactériologique des Crachats

EFR : Exploration Fonctionnelle Respiratoire

LBA : Liquide Broncho-Alvéolaire

MH : Mueller-Hinton

min : minute

ORL : Oto-Rhino-Laryngologie

pb : paires de bases

PCR : Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérisation en chaîne)

PLP : Protéine Liant les Pénicillines

UFC : Unité Formant Colonie

VEMS : Volume Expiratoire Maximal Seconde

Nom – Prénom de l'étudiant :

Nom du Président de Jury :

Date de soutenance de la thèse :

Mention :

VU, le Président de Jury,

VU, le Directeur de la Section Pharmacie
De l'U.F.R. Médecine-Pharmacie de ROUEN,

RESUME

La mucoviscidose est une pathologie complexe, notamment sur le plan des infections respiratoires, qui occupent une place importante dans la gravité de la maladie. Bien que *Staphylococcus aureus* soit une des plus fréquentes bactéries retrouvée chez ces patients, son rôle dans le déclin de la fonction respiratoire reste controversé, et les caractéristiques de la colonisation par cette bactérie encore peu connues.

Ce travail a consisté à décrire la dynamique de colonisation par *Staphylococcus aureus* des patients atteints de mucoviscidose suivis au CHU de Rouen, plus particulièrement au moment de la transition SAMS/SAMR, ainsi que d'étudier les circonstances de survenue des SAMR chez ces patients. Cette description comprend l'étude des caractéristiques phénotypiques et génotypiques par *spa*-typing des *Staphylococcus aureus*, ainsi que l'analyse des antibiothérapies administrées avant et après l'émergence du SAMR.

Une persistance d'une même souche de SAMS a été majoritairement retrouvée, avec la présence fréquente de co-colonisation SAMS/SAMR, ainsi que d'une diversité phénotypique de variants d'une même souche. L'émergence de SAMR chez ces patients est principalement due à l'acquisition d'une nouvelle souche, qui a tendance à persister, et est précédée d'une antibiothérapie potentiellement sélectionnante dans seulement deux tiers des cas. Enfin, le SAMR est presque toujours pris en compte dans le traitement antibiotique mais n'est que partiellement éradiqué.

MOTS CLES :

Mucoviscidose – *Staphylococcus aureus* – dynamique de colonisation – SAMS – SAMR – *spa*-typing – persistance – co-colonisation – antibiothérapie – éradication.